



**Ana Cristina Roxo de Almeida**

Licenciada em Engenharia do Ambiente

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *LEMNA MINOR* L. COMO BIOINDICADOR DE TOXICIDADE EM ÁGUAS RESIDUAIS**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia do Ambiente, Perfil de Engenharia  
Sanitária

Orientador: Michiel Adriaan Daam, Investigador  
Pós-Doutoramento, FCT – UNL

Coorientador: Professor Doutor António Manuel  
Fernandes Rodrigues, Professor Auxiliar, FCT – UNL

Júri:

Presidente: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Ferrão Ribeiro da Costa

Arguente: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Ferrão Ribeiro da Costa

Vogal(ais): Prof.<sup>a</sup> Rita Maurício Rodrigues Rosa

Doutor Michiel Adriaan Daam



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro de 2018**



### **CONTRIBUTO PARA ESTABELECIMENTO DE NORMA TÉCNICA**

Copyright © Ana Cristina Roxo de Almeida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Ao Doutor Michiel Daam, por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho e pela amizade, orientação, liberdade de escolha e transmissão de conhecimentos, fundamentais à realização desta dissertação.

Ao Professor Doutor António Rodrigues por ter aceite a coorientação deste trabalho, pela partilha de conhecimentos, cedência de material, por me ter acolhido no laboratório e amizade sempre demonstrada.

À Doutora Raquel Moreira da Universidade de São Paulo pelo precioso apoio nas análises estatísticas.

À D. Luísa e D. Adélia pelo precioso apoio prestado nas determinações analíticas realizadas, por toda a vossa disponibilidade e simpatia que sempre me demonstraram.

Ao Francisco, por todas as horas de pesquisa e configuração do programa, pela transmissão de conhecimentos, pelo apoio e amizade incondicional demonstrada desde do início até ao fim desta jornada, a minha admiração e gratidão.

Aos meus amigos e colegas de mestrado, por todo o apoio que me deram e por todos os bons momentos passados durante estes anos de convívio.

Às minhas colegas de casa, Catalina, Marta Gato, Marta Silva e Sofiya, pela cumplicidade que logo nos uniu e a amizade demonstrada.

À SIMARSUL, por me ter autorizado a recolha de efluentes e ao Professor Doutor António Mano por ter disponibilizado os contactos necessários.

À minha família, pelo apoio, compreensão, paciência, disponibilidade e carinho demonstrado durante todo o meu percurso académico, a minha admiração e gratidão.

À minha mãe, pelo enorme amor, compreensão, cumplicidade, disponibilidade, paciência, ensinamentos e esforço, demonstrado em toda a minha vida, a minha admiração e gratidão eterna. Esta dissertação dedico-a inteiramente a ti.



## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da macrófita flutuante *Lemna minor* como bioindicador de toxicidade numa água residual doméstica, avaliando a eficiência de tratamento da ETAR de Fernão Ferro. Deste modo, foram efetuados ensaios de ecotoxicidade com *L. minor* na água residual bruta e tratada, tendo sido avaliado o número de frondes e a área foliar, para calcular a taxa de crescimento específica média e *yield*. Os testes de ecotoxicidade em água são bastante importantes, em particular quando a matriz aquosa é complexa como é o caso das águas residuais que contêm muitos compostos dissolvidos.

Na água residual bruta obteve-se, para o parâmetro número de frondes, uma CE<sub>50</sub> de 4,6% para *yield* e de 11,2% para a taxa de crescimento específica média, enquanto que para a área foliar, obteve-se uma CE<sub>50</sub> de 9,6% tanto para *yield* como para a taxa de crescimento específica média. Os valores obtidos indicam que uma percentagem de água residual bruta apresenta uma elevada inibição no crescimento de *L. minor*.

Apesar do efluente ter sido tratado na ETAR, a água residual tratada apresentou uma toxicidade só ligeiramente inferior à da água residual bruta. De realçar que, apesar desta toxicidade, os valores dos parâmetros físico-químicos da água residual tratada, como CQO, SST e fósforo total, não ultrapassaram os valores limites de emissão exigidos pelo Decreto-Lei n.º 236/98.

Os resultados permitiram concluir que tanto a água residual bruta como a água residual tratada, apresentaram elevada inibição de crescimento de *L. minor*. O potencial deste macrófita como bioindicador para os testes de ecotoxicidade foi demonstrado, permitindo avaliar se o processo de tratamento é suficiente para diminuir o impacto no meio aquático recetor.

Palavras-chave:

Águas residuais, teste de ecotoxicidade, *Lemna minor*, macrófitas





## Abstract

The aim of the present work was to evaluate the potential of the floating macrophyte *Lemna minor* as a bioindicator of toxicity in domestic wastewater, evaluating the treatment efficiency of the waste water treatment plant Fernão Ferro. To this end, toxicity tests were carried out with *L. minor* using both untreated and treated wastewater, and the frond number and frond area were evaluated to enable calculation of toxicity values for the average specific growth rate and yield. Ecotoxicological tests are particularly important in complex water samples, which is the case for domestic wastewater.

In the untreated wastewater, an EC<sub>50</sub> of 4,6% was obtained for yield and 11,2% for the average specific growth rate for frond numbers frond area, an EC<sub>50</sub> of 9,6% was obtained for both yield and the average specific growth rate. These toxicity values indicate that a small percentage of untreated wastewater has a high growth inhibition for *L. minor*.

The treated wastewater showed toxicity values that were only slightly lower than those obtained for the untreated wastewater. Interestingly, besides this toxicity, the values measured for physical-chemical parameters, i.e. COD, TSS and total phosphorus, did not exceed their water quality standards required by Decree Law N°236/98.

The results allow to conclude that both the untreated and treated wastewater presented high inhibition of *L. minor* growth. The potential of this macrophyte as a bioindicator for ecotoxicity testing was demonstrated, allowing to evaluate if the treatment process is sufficient to reduce the impact on the receiving waterbody.

Keywords:

Wastewater, ecotoxicity tests, *Lemna minor*, macrophytes



## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento e definição do estudo.....	1
1.2. Objetivos da dissertação .....	3
1.3. Organização da dissertação.....	3
2. Revisão Bibliográfica .....	4
2.1. Importância da Diretiva-Quadro da Água (DQA) .....	4
2.2. Enquadramento legal e controlo da qualidade da água em Portugal .....	8
2.3. Caracterização da água residual e seus constituintes .....	9
2.4. Ecotoxicologia e testes ecotoxicológicos .....	11
2.4.1. Processos e fatores que influenciam a toxicidade .....	14
2.5. Classificação de Testes de toxicidade .....	14
2.5.1. Classificação dos testes de toxicidade segundo o critério de exposição dos organismos-teste.....	15
2.5.2. Classificação dos testes de toxicidade segundo o critério de sistema da solução-teste	16
2.5.3. Tipo de organismos-teste.....	19
2.6. Caracterização da estação de Tratamento de águas residuais de Fernão Ferro	26
2.6.1. Considerações gerais.....	26
2.6.2. Descrição do sistema de tratamento da ETAR de Fernão Ferro.....	26
3. Materiais e métodos .....	32
3.1. Metodologia geral de ensaio .....	32
3.2. Parâmetros de avaliação.....	33
3.2.1. Número de frondes.....	34
3.2.2. Área foliar .....	35
3.3. Organismo-Teste.....	36
3.3.1. Meio nutriente.....	36
3.4. Amostragem da água residual .....	37
3.5. Substância de referência.....	37
3.5.1. Procedimento experimental do teste de referência .....	38
3.6. Efluente-teste .....	38

3.6.1.	Procedimento experimental do teste de inibição de crescimento de <i>L. minor</i>	39
3.7.	Caracterização físico-química da água residual	40
3.7.1.	CQO	40
3.7.2.	Sólidos suspensos totais	40
3.7.3.	Azoto <i>Kjeldahl</i>	41
3.7.4.	Fósforo Total	41
3.8.	Análise de resultados	41
4.	Resultados e Discussão	42
4.1.	Isolamento e crescimento da cultura <i>L. minor</i>	42
4.2.	Teste de referência com o dicromato de potássio	45
4.3.	Teste de inibição de crescimento de <i>L. minor</i> em água residual doméstica	49
4.3.1.	Caracterização da água residual	49
4.3.2.	Toxicidade da água residual doméstica bruta	49
4.3.3.	Toxicidade da água residual tratada	51
5.	Conclusões e perspectivas de trabalhos futuros	54
6.	Referências Bibliográficas	55

## Índice de Figuras

Figura 2.1- <i>Vibrio fischeri</i> .....	21
Figura 2.2- <i>Chlorella vulgaris</i> .....	21
Figura 2.3- <i>Lemna minor</i> .....	23
Figura 2.4- <i>Lemna gibba</i> .....	23
Figura 2.5- <i>Daphnia magna</i> .....	24
Figura 2.6- <i>Oncorhynchus mykiss</i> .....	25
Figura 2.7- <i>Lepomis macrochirus</i> .....	25
Figura 2.8- ETAR de Fernão Ferro .....	26
Figura 2.9- Esquema de tratamento da fase líquida da ETAR de Fernão Ferro .....	27
Figura 2.10- Obra de entrada .....	27
Figura 2.11- Decantador primário.....	27
Figura 2.12- Valas de oxidação.....	28
Figura 2.13- Decantador secundário.....	28
Figura 2.14- Esquema de tratamento da fase sólida da ETAR de Fernão Ferro .....	29
Figura 2.15- Digestor de lamas .....	29
Figura 2.16- Centrífuga .....	29
Figura 2.17- Gasómetro. ....	30
Figura 3.1- Contagem do número de frondes através do programa <i>ImageJ</i> .....	35
Figura 3.2- Delimitação do número de frondes no programa <i>ImageJ</i> .....	35
Figura 3.3- Isolamento da cultura <i>L. minor</i> .....	36
Figura 3.4- Instalação do teste de ecotoxicidade com as águas residuais em condições controladas .....	39
Figura 4.1- Curva de crescimento médio de <i>L. minor</i> em condições padronizadas .....	42
Figura 4.2- Número de frondes de <i>L. minor</i> ao longo do tempo .....	43
Figura 4.3- Crescimento médio de <i>L. minor</i> ao longo do ensaio .....	44
Figura 4.4- Aspeto da cultura <i>L. minor</i> (contaminação por algas) .....	44
Figura 4.5- Aspeto de <i>L. minor</i> após a correção dos fatores ambientais (isenta de algas).45	
Figura 4.6- Inibição da taxa de crescimento específico do nº de frondes de <i>L. minor</i> em função da concentração de dicromato de potássio.....	46
Figura 4.7- Inibição da taxa de crescimento específico da área foliar de <i>L. minor</i> em função da concentração de dicromato de potássio .....	46
Figura 4.8- Fim do teste de referência com dicromato de potássio .....	47
Figura 4.9- Inibição de crescimento de <i>L. minor</i> em função da percentagem de água residual bruta em <b>a)</b> yield e em <b>b)</b> taxa de crescimento média específica, no parâmetro número de frondes e inibição de yield de <i>L. minor</i> em função da percentagem de água residual bruta em <b>c)</b> yield e em <b>d)</b> taxa de crescimento média específica, no parâmetro área foliar .....	51
Figura 4.10- Inibição de crescimento de <i>L. minor</i> em função da percentagem de água residual tratada em <b>a)</b> yield e em <b>b)</b> taxa de crescimento média específica, no parâmetro número	

de frondes e inibição de yield de *L. minor* em função da percentagem de água residual tratada em  
**c)** yield e em **d)** taxa de crescimento média específica, no parâmetro área foliar ..... 53

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1- Resumo da implementação de testes de ecotoxicidade em efluentes em vários países da Europa. ....	12
Tabela 3.1- Composição e respectivas concentrações do meio nutriente . ....	37
Tabela 3.2- Resumo das condições preestabelecidas no teste de ecotoxicidade .....	40
Tabela 4.1- Resumo dos valores de $CE_{50}$ obtidos no teste de ecotoxicidade com dicromato de potássio, com o respetivo intervalo de confiança de 95% .....	48
Tabela 4.2- Resultados obtidos da análise ao efluente bruto e tratado da ETAR de Fernão Ferro, comparativamente aos valores limite de emissão (VLE) .....	49
Tabela 4.3- Resumo dos valores de $CE_{50}$ obtidos no teste de ecotoxicidade com água residual bruta, com o respetivo intervalo de confiança de 95%.....	50
Tabela 4.4- Resumo dos valores de $CE_{50}$ obtidos no teste de ecotoxicidade com água residual tratada, com o respetivo intervalo de confiança de 95%.....	52





## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i>
CBO	Carência bioquímica de oxigénio
CE	Comissão Europeia
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva média
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CI	Concentração de inibição
CL	Concentração letal
CQO	Carência química de oxigénio
DL	Dose letal
DQA	Diretiva Quadro da Água
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
OD	Oxigénio Dissolvido
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
SST	Sólidos suspensos totais
U.S.EPA/EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
VLE	Valores limite de emissão
VMA	Valor máximo admissível
VMR	Valor máximo recomendado



## 1. Introdução

### 1.1. Enquadramento e definição do estudo

A água é um dos recursos naturais mais essenciais à vida na Terra. O acesso a água potável tornou-se um dos maiores desafios da sociedade atual, devido ao crescente desequilíbrio entre o consumo e a disponibilidade de água doce, existente em apenas 3% da água do planeta. O uso crescente de água na agricultura, na indústria e fins domésticos resulta na má qualidade da água e na sua escassez (Jackson et al., 2001).

As descargas das estações de tratamento de águas residuais (ETAR) municipais e industriais, para o meio recetor, foram identificadas como uma das principais fontes de poluição da água nos países industrializados (Prasse et al., 2015). Os avanços nas tecnologias de tratamento das águas residuais são cruciais para limitar a carga de nutrientes e contaminantes microbianos e químicos que entram nas águas superficiais, apesar do processo de tratamento de águas residuais ter um papel importante no desenvolvimento sustentável como ferramenta para a proteção das águas recetoras.

Tendo em conta, o aumento da população mundial e o número crescente de populações servidas por ETAR é previsível, no futuro, um aumento de águas residuais descarregadas para o meio recetor. Por sua vez, devido à escassez crescente de água será exigida a reutilização da água residual devidamente tratada.

As ETAR com tratamento secundário não têm capacidade de remover todos os nutrientes e contaminantes dissolvidos, podendo apenas diminuir as suas concentrações para um valor aceitável.

Atualmente, a qualidade da água nos efluentes tratados tem sido usualmente baseada no controlo dos parâmetros como carência bioquímica de oxigénio ( $CBO_5$ ), carência química de oxigénio (CQO), sólidos suspensos totais (SST) fósforo total e azoto total, em vários países, incluindo Portugal. Afim de prevenir a libertação contínua de micropoluentes orgânicos e inorgânicos da ETAR em águas superficiais, a Comissão Europeia adotou a Diretiva Quadro da Água, que exige um bom estado em termos de quantidade e qualidade (químico e ecológico), implementando a melhor técnica disponível para controlar a sua emissão (Bundschuh et al., 2011; Gargosova & Urminka, 2017; Prasse et al., 2015; Reemtsma et al., 2006).

As análises químicas podem detetar muitos compostos dissolvidos na ordem dos picogramas por litro nas águas residuais, mas dificilmente é possível identificar a totalidade dos compostos dissolvidos presentes nas águas residuais em concentrações muito baixas. Porém, ainda é difícil a identificação de alguns compostos (devido a concentrações abaixo do limite de deteção). Também deve ter-se em conta os possíveis efeitos combinados, como os sinergismos e antagonismos, nos compostos presentes na água residual. Por isso, é relevante realizar não só análises químicas, como também ensaios ecotoxicológicos para avaliar os efeitos biológicos

causados pelas descargas de águas residuais nos meios recetores aquáticos (Gargosova & Urminska, 2017).

Os testes ecotoxicológicos na água são particularmente essenciais quando a matriz é complexa, ou seja, com vários tipos de substâncias dissolvidas, como é o caso das águas residuais que contêm muitos compostos orgânicos e inorgânicos, macronutrientes e micronutrientes dissolvidos. Sendo os componentes emergentes os mais problemáticos devido ao seu impacto a longo prazo no meio aquático, mesmo em concentrações mínimas. A avaliação da toxicidade pode permitir avaliar se o processo de tratamento é suficiente para diminuir o impacto ambiental sobre as águas superficiais e também antever os possíveis efeitos no ecossistema aquático (Bundschuh, 2014; Gargosova & Urminska, 2017; Mendonça et al., 2011).

Segundo Gargosova & Urminska (2017), os organismos mais utilizados e recomendados para testes de ecotoxicidade em meio aquático são: i) os crustáceos *Thamnocephalus platyurus* e *Daphnia magna*, como representantes dos consumidores, ii) a planta aquática *Lemna minor* e iii) a planta terrestre *Allium cepa*, como representantes dos produtores primários e iv) a bactéria marinha *Vibrio fischeri* como decompositor.

As macrófitas flutuantes do género *Lemna* encontram-se distribuídas em ecossistemas lênticos como lagos, lagoas e corpos de água salobros por várias regiões dos continentes, exceto no Ártico e Antártica. A família *Lemnaceae* compreende cinco géneros, com 37 espécies de plantas monocotiledóneas aquáticas e contém as menores angiospérmicas do mundo, em que algumas espécies atingem o comprimento máximo de 0,3 milímetros (Appenroth et al., 2013; Cheng & Stomp, 2009; Hillman et al., 1978; Les et al., 2002). Estas plantas possuem uma taxa de crescimento exponencial, tendo tempos de duplicação de dois dias ou menos, como é o caso da *Lemna minor*, também conhecida como lentilha-de-água. Esta alta taxa de reprodução ocorre quando a cultura é realizada sob condições padronizadas ideais, como a temperatura e intensidade luminosa. Este género possui uma notável capacidade de adaptação a diversos climas e condições, como também a tolerância ao stresse dos mecanismos de adaptação (Appenroth et al., 2013).

Estas propriedades desta macrófita são importantes para inúmeras aplicações práticas, como a utilização da biomassa para a produção de etanol. Também o elevado teor em proteína em algumas espécies torna a biomassa rentável para ração animal (Chen et al., 2012; Cheng & Stomp, 2009). Outra aplicação, para *L. minor* é como biofertilizante, em substituição da fertilização química tradicional (Kamyab et al., 2017). Por outro lado tem sido estudado o comportamento de *Lemna* spp. no tratamento de efluentes sobretudo em tratamento terciário para a remoção de nutrientes e para a remoção de metais pesados (Drost et al., 2007; Hou et al., 2007; Modlitbová et al., 2018). Todavia, a biomassa produzida através da remoção de metais pesados coloca entraves à sua utilização em biofertilização ou nutrição animal e humana, devendo ser posteriormente retirada e incinerada.

As águas residuais domésticas e industriais são as principais fontes de poluição no ecossistema aquático a nível mundial. Os efeitos de poluição no biota aquático são diversos, como alterações patogénicas nos tecidos, efeitos estrogénicos e endócrinos (Schlacher et al., 2005).

## 1.2. Objetivos da dissertação

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial da macrófita flutuante *Lemna minor* como bioindicador de toxicidade numa água residual doméstica, avaliando a eficiência de tratamento da ETAR.

## 1.3. Organização da dissertação

O trabalho inicia-se com uma revisão da bibliografia focando os seguintes temas: descrição da Diretiva-quadro da água e a sua importância a nível da proteção das águas, relativamente à sua qualidade ecológica e química, como também o enquadramento legal em relação ao controlo da qualidade da água e os parâmetros que caracterizam as águas residuais. Ainda de cariz introdutório, nos capítulos descrevem-se os fatores e processos que influenciam a toxicidade, a classificação dos testes ecotoxicológicos e do tipo de organismos-teste, bem como se descreve o sistema de tratamento de águas residuais domésticas da ETAR de Fernão Ferro (capítulo 2).

No capítulo 3, refere-se os ensaios experimentais realizados, descrevendo-se as metodologias seguidas nos ensaios de implementação e crescimento de *L. minor*, os parâmetros de avaliação, a amostragem do efluente-teste e as análises físico-químicas realizadas para a caracterização do efluente bruto e tratado. No capítulo 4 são apresentados, os resultados obtidos e a sua análise, referente à caracterização dos ensaios de crescimento de *L. minor* e aos testes de ecotoxicidade com a macrófita *L. minor* em águas residuais brutas e tratadas. Por último, descrevem-se as principais conclusões referentes ao potencial de *L. minor* como bioindicador de toxicidade em águas residuais domésticas (capítulo 5).

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Importância da Diretiva-Quadro da Água (DQA)

Em 1994, a Comissão Europeia apresentou uma proposta de Diretiva relativa à qualidade ecológica e química das águas, (COM(93) 680 final), que visava desenvolver e aplicar as conclusões do Seminário Ministerial sobre a Política da Água na Comunidade, devido à crescente exigência dos cidadãos e das organizações ambientais (European Commission, 2006). Não obstante, continuava a aumentar a poluição das águas costeiras e dos estuários como também a qualidade das águas interiores, devendo-se ao facto das normas de qualidade e os valores-limite de emissão, criados nessa legislação comunitária, apenas se aplicarem a específicos tipos de águas e abrangerem apenas determinados aspetos de qualidade das águas (APA, 2006). Em 1997, a Comissão Europeia reconheceu a insuficiência da legislação relativa à proteção das águas, e apresentou a primeira proposta da Diretiva Quadro da Água, que estabelecia várias disposições relativas à qualidade ecológica das águas, como também a necessidade de maior integração dos aspetos qualitativos e quantitativos para uma gestão sustentável das águas. Apenas em 2000, após um extenso processo de negociações foi adotada pelo Parlamento Europeu e Conselho, a Diretiva-Quadro da Água (2000/60/CE) que tem sofrido várias alterações tratando aspetos mais específicos, dos quais se destacam respetivamente, a Decisão n.º 2455/2001/CE, de 20 de novembro que estabelece a lista das substâncias prioritárias e as suas normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, a Diretiva 2006/11/CE, de 15 de fevereiro relativa à poluição causada por determinadas substâncias perigosas lançadas no meio aquático da Comunidade (atualmente parcialmente revogada), a Diretiva 2008/32/CE, de 11 de março de 2008 que altera a DQA, estabelecendo um quadro de ação comunitária no domínio da política da água, no que diz respeito às competências de execução atribuídas à Comissão, a Diretiva 2013/39/UE, de 12 de agosto relativa às substâncias prioritárias no domínio da política da água. Assim como, foram criadas várias Diretivas-filhas, afim de fornecer mais suporte à Diretiva Quadro da Água (APA, 2006; Decisão n.º 2455/2001/CE de 20 de Novembro, 2001; Diretiva 2006/11/CE de 15 de Fevereiro, 2006; Diretiva 2008/32/CE de 11 de Março, 2008; Diretiva 2013/39/UE de 12 de agosto, 2013).

A DQA foi transposta para a ordem jurídica nacional pela Lei n.º 58/2005, de 29 de dezembro (Lei da Água), estabelecendo as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas, sendo retificada pela Declaração de Retificação n.º 11-A/2006, de 23 de fevereiro, e modificada pelos Decretos-Lei n.º 245/2009, de 22 de setembro, n.º 60/2012, de 14 de março, n.º 130/2012, de 22 de junho, e alterada ainda na Leis n.º 17/2014, de 10 de abril, n.º 46/2016, de 28 de dezembro e n.º 44/2017, de 19 de junho (Declaração de Rectificação n.º 11-A/2006 de 23 de Fevereiro, 2006; Decreto-Lei n.º 130/2012 de 22 de junho, 2012; Decreto-Lei n.º 245/2009 de 22 de Setembro, 2009; Decreto-Lei n.º 60/2012 de 14 de março, 2012; Lei n.º 17/2014 de 10 de abril, 2014; Lei n.º 42/2016 de 28 dezembro, 2016; Lei n.º 44/2017 de 19 de junho, 2017).

A DQA constitui o principal instrumento da nova política da água na União Europeia, que pretende estabelecer um enquadramento legal mais eficaz, transparente e coerente apoiado num conjunto de princípios que a longo prazo serão necessários para a proteção e uso sustentável da água, de modo a proteger os ecossistemas aquáticos e terrestres e zonas húmidas. Dentro dos aspetos principais com mais destaque apresentados pela DQA, é possível destacar a abordagem integrada de proteção das águas, quer superficiais quer subterrâneas, e uma avaliação do estado das águas através de uma abordagem ecológica, planeamento integrado a nível da bacia hidrográfica (i.e. transpondo fronteiras entre países), criação de uma estratégia para a eliminação da poluição causada por substâncias perigosas, instrumentos financeiros, aumento da divulgação da informação e incentivo da participação do público e a organização do quadro legal comunitário (APA, 2006; Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro, 2000).

A criação da DQA, modificou o modo de controlo da qualidade da água realizados em todos os Estados-Membros, tornando-se um dos instrumentos mais importantes da legislação ambiental estabelecida pela União Europeia (Allan et al., 2006; De Stefano, 2010).

Esta diretiva teve como objetivo a conservação e melhoramento da qualidade das águas na Comunidade Europeia até 2015, sendo o controlo da qualidade um dos acessórios para garantir a boa qualidade das águas e consequentemente a adoção de medidas quantitativas que contribuirão para o objetivo de garantia de uma boa qualidade (Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro, 2000; Hering et al., 2003; Sánchez-Montoya et al., 2012).

Em 2012, o balanço da qualidade da política da União Europeia relativa ao estado da água doce, confirmou que cerca de metade das águas superficiais não alcançariam um bom estado ecológico até 2015, devido a lacunas graves na monitorização do estado químico das águas de superfície. Em 2015 foi criado o quarto relatório de avaliação da DQA, programa de medidas e Diretiva Inundações, medidas estas com finalidade de conciliar objetivos ambientais e económicos, de modo a assegurar a sustentabilidade e viabilidade da agricultura e aquicultura na União Europeia (European Commission, 2018).

A DQA tem como último objetivo a redução, até níveis considerados aceitáveis, das substâncias poluentes prioritárias e contribuir para atingir os de valores próximos de substâncias naturalmente presentes (Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro, 2000). Seguindo-se por outras políticas comunitárias no âmbito do ambiente, esta diretiva baseia-se nos princípios da precaução, da ação preventiva, e da correção, prioritariamente na fonte, e no princípio do poluidor-pagador.

No que diz respeito aos objetivos ambientais presentes no artigo 4º em relação às águas superficiais, a diretiva pretende proteger e melhorar todos os meios hídricos com o objetivo de obter o bom estado ecológico e químico, como também reduzir progressivamente a poluição causada por substâncias prioritárias, a eliminação das descargas e emissões de substâncias perigosas para níveis históricos. Estes objetivos serão cumpridos através da criação de programas de medidas (artigo 11º) que por sua vez devem ser integrados nos Planos de Gestão de Bacias Hidrográficas (artigo 13º).

No anexo V da DQA, é possível encontrar as classificações do estado ecológico da água quanto à qualidade estrutural e funcional dos ecossistemas, classificando-a como excelente, boa, razoável, medíocre e má. Tais classificações variam consoante o tipo de água a avaliar, baseando-se em parâmetros de qualidade físico-químicos, biológicos e hidromorfológicos estabelecidos através de programas de monitorização (Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro, 2000). O estado físico-químico da água é avaliado consoante a presença de substâncias ou grupo de substâncias tóxicas, persistentes e suscetíveis de bioacumulação, através de parâmetros como condições térmicas, oxigenação, salinidade, estado em nutrientes, estado de acidificação, substâncias prioritárias e outros poluentes. A frequência da monitorização para estes parâmetros é superior aos elementos de qualidade biológica ou hidromorfológica. Nos parâmetros biológicos, os elementos de qualidade são o fitoplâncton e outra flora aquática, macroinvertebrados, peixes; enquanto nos parâmetros hidromorfológicos, os elementos de qualidade dividem-se entre continuidade, hidrologia e morfologia.

No anexo X encontra-se a lista das substâncias químicas cujas concentrações devem ser reduzidas ou eliminadas prioritariamente em descargas e emissões para as águas superficiais (Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro, 2000; Diretiva 2013/39/UE de 12 de agosto, 2013).

Anteriormente à criação da DQA, os programas de monitorização da qualidade da água baseavam-se principalmente em parâmetros físico-químicos, e apenas metade dos programas incluíam parâmetros biológicos, na avaliação e classificação da qualidade (Hering et al., 2003; Sánchez-Montoya et al., 2012).

São especificados na DQA três tipos de controlo: de vigilância, operacional e de investigação. O controlo de vigilância avalia as alterações da qualidade da água a longo prazo, fornecendo dados de base sobre as bacias hidrográficas, permitindo a conceção e implementação de outros tipos de monitorização. Se o estado de boa qualidade da água é atingido, apenas o controlo de vigilância é necessário. A monitorização operacional destina-se a fornecer dados adicionais sobre massas de água em risco ou que não obedeçam aos objetivos ambientais da DQA, enquanto o controlo de investigação permite avaliar as causas (Allan et al., 2006).

De modo a assegurar uma boa gestão da qualidade da água é necessário a utilização de um conjunto de ferramentas e de tecnologias de baixo custo que permitam obter dados significativos e fiáveis.

Para a implementação da DQA ser bem-sucedida, a monitorização clássica apenas apoiada na amostragem pontual e em parâmetros de qualidade físico-químicos, tem limitações. O desenvolvimento nos últimos anos de novas técnicas alternativas mais representativas e de baixo custo, podem fornecer informações mais concretas sobre os efeitos biológicos e tóxicos responsáveis pela biodisponibilidade de contaminantes, a variação temporal e espacial dos mesmos como também a deteção precoce de fenómenos de poluição (Allan et al., 2006). Devem ser criadas estruturas de garantia de qualidade da água de modo a permitir uma monitorização eficaz em toda a Europa. No entanto, não há dúvida de que a combinação destas técnicas mais inovadoras associadas a uma monitorização ecológica, permitem uma avaliação da qualidade da



água muito mais representativa, conforme o imposto pela DQA (Allan et al., 2006; Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro, 2000).

## 2.2. Enquadramento legal e controlo da qualidade da água em Portugal

O Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de agosto veio fazer a transposição de várias diretivas comunitárias relativas à qualidade da água como também clarificar as competências de várias entidades responsáveis pela qualidade da água, numa perspetiva de proteção da saúde pública, de gestão integrada dos recursos hídricos e preservação do ambiente. Este diploma tem como objetivo estabelecer normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. São definidas também normas de descarga das águas residuais na água e no solo, de modo a promover a qualidade do meio aquático e a proteção da saúde pública e dos solos. Este decreto-lei estabelece objetivos, classificações, normas de qualidade, verificações de conformidade e planos de ação e de gestão, para águas subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano, águas para suporte da vida aquícola e águas de rega e balneares. Em novembro de 1998, o decreto-lei n.º 236/98 sofreu uma retificação com a Declaração de Retificação n.º 22-B/98. O decreto-lei supracitado classifica as águas superficiais destinadas à produção de água para consumo humano, consoante a sua qualidade nas categorias A1, A2 e A3, a que correspondem os esquemas de tratamento distintos, fixa também o valor limite de emissão (VLE), expresso em unidades específicas para cada parâmetro, a concentração ou o nível de emissão de determinada substância que não pode ser excedido por uma instalação na descarga no meio aquático ou solo. O valor máximo admissível (VMA) corresponde ao valor de norma de qualidade que não deverá ser ultrapassado, enquanto o valor máximo recomendado (VMR) refere-se ao valor de norma de qualidade que, de preferência, deve ser respeitado ou não excedido (Declaração de Rectificação n.º 20-AT/2001, 2001; Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto, 1998).

O regime da qualidade da água destinada ao consumo humano é estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 306/2007, que procedeu à revisão do decreto-lei n.º 243/2001, de 5 de setembro, que transpõe a Diretiva n.º 98/83/CE, do Conselho Europeu, de 3 de novembro, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, mantendo aspetos fundamentais do anterior diploma, o decreto-lei n.º 236/98. Tendo este decreto-lei como objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos da possível contaminação da água e assegurar a disponibilização da água salubre, limpa e de composição equilibrada, tendo modificado a lista de parâmetros a realizar no controlo de qualidade, abordando também o uso de forma racional dos pesticidas (Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto, 2007).

O tratamento de águas residuais urbanas é regulamentado pelo decreto-lei n.º 152/97, de 19 de junho, transpondo a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de maio de 1991, na parte referente à conceção dos sistemas de drenagem e tratamento das águas residuais, como também o licenciamento das descargas de águas residuais urbanas como também industriais e tem como objetivo a proteção das águas superficiais dos efeitos das descargas de águas residuais urbanas. O referido decreto-lei, foi posteriormente alterado pelos decretos-lei n.º 348/98, de 9 de novembro, n.º 261/99, de 7 de julho, n.º 172/2001, de 26 de maio, n.º 198/2008, de 8 de outubro e n.º 133/2005, de 13 de junho, no que diz respeito à identificação das zonas sensíveis e a zonas

menos sensíveis para descarga e a qualidade das águas residuais descarregadas nos meios sensíveis (Decreto-Lei n.º 133/2015 de 13 de julho, 2015; Decreto-Lei n.º 152/97 de 19 de Junho, 1997; Decreto-Lei n.º 172/2001 de 26 de Maio, 2001; Decreto-Lei n.º 198/2008 de 8 de Outubro, 2008; Decreto-Lei n.º 261/99 de 7 de julho, 1999; Decreto-Lei n.º 348/98 de 9 de Novembro, 1998; Diretiva n.º 91/271/CEE de 21 de Maio, 1991).

A Lei da Água, Lei n.º 58/2005 de 29 de dezembro, transpõe para a ordem jurídica nacional a Diretiva n.º 2000/60/CE (i.e. a DQA descrito no capítulo 2.1), do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro, estabelecendo um enquadramento para gestão das águas superficiais, designadamente as águas interiores, de transição e costeiras, e das águas subterrâneas. Esta lei tem como objetivo evitar a continuação da degradação, a proteção e o melhoramento do estado dos ecossistemas aquáticos e também dos ecossistemas terrestres e zonas húmidas, para promover assim uma utilização sustentável de água.

A Comissão Europeia através da DQA, obrigou os Estados-Membros a transpor as disposições nas suas legislações nacionais até ao final de 2003, quando o primeiro ciclo de planeamento teve início, enquanto Portugal as transpôs para a ordem jurídica nacional em finais de 2005 (APA, 2006; De Stefano, 2010).

### 2.3. Caracterização da água residual e seus constituintes

A água residual é caracterizada pela sua composição física, química e biológica. A caracterização física envolve a determinação de sólidos (sólidos totais, sólidos voláteis totais, sólidos suspensos totais, sólidos dissolvidos totais, entre outros), turbidez, cor, pH, cheiro, temperatura, condutividade e a densidade. Na caracterização química inorgânica, os parâmetros a determinar são azoto amoniacal, azoto total, nitritos, nitratos, fósforo total, fósforo inorgânico e fósforo orgânico. Estes parâmetros apresentam a quantidade de nutrientes presentes na água residual e o seu grau de decomposição. Também metais dissolvidos como arsénio, chumbo, cádmio, crómio, cobre, níquel e mercúrio são parâmetros de grande importância devido aos seus efeitos de toxicidade (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto, 1998).

As características químicas orgânicas envolvem a determinação de parâmetros como CBO<sub>5</sub> (carência bioquímica de oxigénio em 5 dias), CQO (carência química de oxigénio) para medição da quantidade de oxigénio necessário para estabilizar um resíduo.

A caracterização biológica refere-se a organismos coliformes, como coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais, que permitem a avaliação de organismos patogénicos e a eficácia dos processos de desinfeção, tratando-se igualmente a toxicidade como parâmetro biológico (Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto, 1998; Metcalf & Eddy, 2003).

No tratamento secundário das águas residuais domésticas, a maior preocupação é com a remoção de matéria orgânica biodegradável, sólidos suspensos totais e agentes patogénicos e

matéria inorgânica dissolvida, pois tratam-se dos principais constituintes mais preocupantes no tratamento das águas residuais. Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidos padrões mais exigentes nas diferentes fases de tratamento no que diz respeito à remoção de nutrientes, metais pesados e substâncias prioritárias (Metcalf & Eddy, 2003).

Os sólidos suspensos, apesar de terem matéria orgânica biodegradável, podem desenvolver depósitos de lamas e condições de anaerobiose, quando a água residual não tratada é descarregada para o ambiente aquático. A matéria orgânica biodegradável, principalmente composta por proteínas, glúcidos e gorduras, se descarregada sem qualquer tipo de tratamento no meio aquático, a estabilização biológica da matéria orgânica poderá levar à depleção do oxigénio no meio aquático. Os nutrientes como o carbono, compostos de azoto e de fósforo são essenciais ao crescimento dos seres vivos, mas a descarga destes compostos no meio aquático, pode contribuir para acelerar os processos de eutrofização.

As atividades industriais podem contribuir para o aumento dos metais pesados nas águas residuais, tendo elevado nível agudo de toxicidade e causador de fenómenos de carcinogénese e mutagénese nos organismos. Também matérias orgânicas de elevada persistência como os pesticidas agrícolas e fenóis apresentam elevada resistência aos sistemas de tratamento de águas residuais convencionais (Metcalf & Eddy, 2003).

Os sistemas convencionais de tratamento de águas residuais, que maioritariamente possuem apenas tratamento secundário não têm a capacidade de remover na íntegra todos os nutrientes e contaminantes dissolvidos na água residual, tendo apenas a capacidade de reduzir as concentrações das substâncias para um valor aceitável. No entanto, o processo de tratamento de águas residuais tem um papel fundamental no desenvolvimento sustentável como ferramenta para a proteção das águas superficiais. Por conseguinte, vários poluentes emergentes são descarregados nas águas superficiais, onde podem representar riscos para a saúde pública. As substâncias emergentes podem afetar o ecossistema aquático e potencialmente interromper processos naturais importantes do ecossistema, como a decomposição da matéria orgânica (Bundschuh & Schulz, 2011; Maul et al., 2006; Webb et al., 2003).

As análises físico-químicas têm a capacidade de detetar muitas substâncias e compostos dissolvidos nas águas residuais, mas muito dificilmente conseguem identificar na totalidade todos os compostos dissolvidos presentes em concentrações muito baixas nas águas residuais (Bundschuh, 2014).

## 2.4. Ecotoxicologia e testes ecotoxicológicos

A ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, terrestres ou aquáticos, que integram a biosfera, incluindo também a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos habitam. Assim, a ecotoxicologia aquática é a ciência que serve de suporte na resolução de problemas relacionados com a contaminação da massa de água por substâncias ou compostos tóxicos (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Walker et al., 2001).

No início da década de 1980, as agências ambientais americanas (US. EPA) e europeias (OECD), começaram a desenvolver protocolos standardizados de testes ecotoxicológicos utilizando organismos aquáticos como algas, crustáceos e peixes, para fins de monitorização da qualidade da água e avaliar os efeitos de substâncias químicas e as das suas misturas para os organismos aquáticos (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Em vários países europeus como Alemanha, Bélgica, Dinamarca, França, Noruega, Espanha, Suécia, Holanda, Irlanda e Reino Unido, têm sido implementados, testes ecotoxicológicos para controlo e avaliação das águas residuais domésticas e industriais, nas licenças de descarga, na determinação de valores limite de emissão e também na investigação. Estes países realizam testes de ecotoxicidade à água residual para proteção dos meios aquáticos de forma rotineira. O tipo de ensaios ecotoxicológicos realizados e o tipo de organismos-teste, encontram-se descritos na Tabela 2.1 (Power & Boumphrey, 2004).

Em Portugal não existe legislação disponível sobre os ensaios ecotoxicológicos de monitorização dos efluentes. No entanto, quando são consideradas as condições de descarga de efluente para o meio aquático, sendo o objetivo a proteção da integridade dos ecossistemas aquáticos, apenas é utilizada uma metodologia baseada em valores limite de emissão (VLE) para poluentes especificamente identificados (Picado et al., 2008; Power & Boumphrey, 2004).

Tabela 2.1- Resumo da implementação de testes de ecotoxicidade em efluentes em vários países da Europa Power & Boumphrey, (2004)

Países	Experiência de aplicação de testes ecotoxicológicos em efluentes	Tipo de teste	Organismos-teste
<b>Alemanha</b>	Uso rotineiro de testes padronizados desde 1976. Extensa pesquisa e desenvolvimento para implementação de bioensaios nos efluentes	Agudo, crónico, genotoxicidade e mutagenicidade.	Algas, plantas, invertebrados, peixes e bactérias
<b>Bélgica</b>	Algumas pesquisas específicas sobre efluentes industriais	Agudo e crónico	Invertebrados, bactérias e algas
<b>Dinamarca</b>	Pesquisa de caracterização de efluentes abrangendo 23 indústrias	Agudo/crónico e biodegradação	Algas, plantas, invertebrados, peixes e bactérias
<b>Espanha</b>	Existência de regulamentação no uso dos testes ecotoxicológicos com <i>Daphnia</i> e <i>Vibrio fischeri</i> no controlo de efluentes	Agudo	Invertebrados, bactérias e algas
<b>França</b>	Monitorização de rotina e uso ocasional em licenças de descarga	Agudo, crónico e mutagenicidade	Algas, invertebrados, bactérias e peixes
<b>Holanda</b>	Não existe regulamentação para uso de bioensaios. Existência de muitos estudos realizados em diferentes setores da indústria	Agudo, crónico, mutagenicidade e enzimático	Algas, plantas, invertebrados, peixes e bactérias
<b>Irlanda</b>	Bioensaios aplicados de modo rotineiro para caracterização, monitorização e licenciamento de descargas de efluentes	Agudo e crónico	Algas, plantas, invertebrados, peixes e bactérias
<b>Noruega</b>	Bioensaios utilizados na caracterização e licenciamento de efluentes na indústria	<sup>1</sup>	Algas, plantas, invertebrados e peixes
<b>Reino Unido</b>	Não existe regulamentação para uso de bioensaios a nível nacional, no entanto, é utilizada para monitorização local	Agudo e crónico	Algas, plantas, invertebrados, peixes e bactérias
<b>Suécia</b>	Os bioensaios são utilizados nas licenças de descarga de efluentes e fazem parte das diretrizes de Caracterização de Descargas Industriais (CDI) desde 1989, mas apenas são aplicados a indústrias de maior dimensão	Agudo, crónico, mutagenicidade e enzimático	Algas, plantas, invertebrados, peixes e bactérias

<sup>1</sup> Sem informação sobre este aspeto.

O uso de testes ecotoxicológicos simples ou o uso de uma bateria de testes ecotoxicológicos, que consistem em testes com diferentes espécies de organismos que representam diferentes níveis tróficos na cadeia alimentar aquática, (produtor primário, consumidor primário e consumidor secundário) e possuem a capacidade de refletir a qualidade da água (Farré & Barceló, 2003; Qu et al., 2013; Silva et al., 2009).

As águas residuais possuem uma matriz complexa e, portanto, contêm muitos compostos orgânicos e inorgânicos, macronutrientes e micronutrientes dissolvidos. Todavia, a identificação de alguns compostos não detém a capacidade de fornecer dados suficientes, no que diz respeito aos possíveis efeitos combinados, como os efeitos sinérgicos e antagonistas, dos compostos em mistura na água residual e o seu potencial efeito no ecossistema aquático. Portanto, é essencial realizar não só apenas análises químicas mas também métodos biológicos, como os testes ecotoxicológicos, para avaliar os efeitos biológicos provocados no ecossistema pelas descargas de águas residuais para os meios recetores (Bundschuh, 2014; Gargosova & Urminska, 2017).

Os poluentes emergentes presentes nas águas residuais são os constituintes mais problemáticos, isto porque as ETAR não têm a capacidade de remover estas substâncias, mesmo em concentrações mínimas. A avaliação da toxicidade pode permitir determinar i) se o processo de tratamento das águas residuais é suficiente para diminuir o impacto ambiental sobre as águas superficiais e ii) também antever os possíveis efeitos na componente biota, iii) avaliar o grau de tratamento de águas residuais necessário para atender aos requisitos de controlo da poluição da água, iv) determinar a eficácia dos métodos de tratamento de águas residuais e v) estabelecer limites permissíveis para descarga de efluentes. Os testes ecotoxicológicos podem ser utilizados na avaliação e controlo de efluentes, ajudando os objetivos regulatórios, como a DQA, ou a legislação nacional. (Bundschuh, 2014; Gargosova & Urminska, 2017; Metcalf & Eddy, 2003; Picado et al., 2008).

É importante referir, que os testes ecotoxicológicos além de fornecerem dados relevantes para o aprimoramento de técnicas que possam garantir a redução do risco potencial de substâncias tóxicas, também avaliam os efeitos sinérgicos, antagónicos e aditivos de todos os componentes químicos, físicos e biológicos que possam afetar adversamente as funções biológicas dos organismos aquáticos. A toxicidade associada de todos os componentes do efluente é determinada, e o efeito de toxicidade pode ser limitado por apenas um parâmetro, a toxicidade do efluente. Como as estratégias de gestão das águas recetoras são baseadas em critérios específicos, os testes de toxicidade facilitam a comparação da toxicidade de águas residuais com critérios de qualidade da água concebidos para proteger não só as espécies sensíveis e representativas e ainda estabelecer limites de descarga que protegerão o ecossistema aquático (Metcalf & Eddy, 2003; Silva et al., 2009).

#### 2.4.1. Processos e fatores que influenciam a toxicidade

A maioria dos testes ecotoxicológicos efetuados com os organismos aquáticos está relacionada com a absorção direta das substâncias químicas presentes na água, na forma de solução, suspensão ou ambas. As substâncias potencialmente tóxicas quando introduzidas no meio recetor, a sua concentração, transformação, transporte e assimilação, dependem das suas características e das propriedades físicas do meio. Algumas substâncias têm a capacidade de persistir no meio, e a sua descarga contínua pode resultar na acumulação em níveis inoportáveis para o meio recetor. Os processos de transporte e transferência determinam a distribuição temporal e espacial das substâncias e são vários os processos que as substâncias sofrem quando descarregadas no meio recetor, como volatilização, dissolução, adsorção, precipitação, sedimentação e ressuspensão (Costa et al., 2008; Walker et al., 2001).

As substâncias com elevada pressão de vapor e baixa solubilidade tendem a volatilizar, já as substâncias de baixa pressão e baixa solubilidade tendem a serem adsorvidas em matérias particuladas e sedimentos. O processo de dissolução é um processo que pode ocorrer quando as substâncias são descarregadas para o meio recetor, e as substâncias com elevada solubilidade tendem a permanecer no meio recetor, podendo assim potenciar os fenómenos de toxicidade. É o caso das substâncias orgânicas polares que aumentam a sua solubilidade na água, o que faz com que sejam volatilizadas lentamente. Dos processos de transformação que ocorrem com mais frequência no meio aquático, destacam-se a hidrólise, fotólise e biodegradação. Nas reações de hidrólise os produtos resultantes são mais solúveis. As várias reações que ocorrem são influenciadas por diversos fatores como pH, temperatura, luz, intensidade luminosa, entre outros.

A luz é um dos fatores mais influenciadores, pois a radiação ultravioleta tem a capacidade de quebrar ligações químicas, contribuindo significativamente na degradação de certas substâncias (Costa et al., 2008).

Os fatores ambientais devem ser controlados durante os ensaios experimentais, pois qualquer mudança poderá inibir o crescimento dos organismos, o que pode ser confundido como toxicidade. Assim, todos os testes de ecotoxicidade devem ocorrer em condições ideais e controladas de temperatura, intensidade luminosa e pH (Costa et al., 2008; OECD, 2006).

#### 2.5. Classificação de Testes de toxicidade

A escolha dos tipos de testes ecotoxicológicos depende dos objetivos do teste, os recursos disponíveis, dos requisitos do organismo-teste, das características do efluente, como as flutuações na toxicidade do efluente, e também dos requisitos impostos pelas organizações de proteção do ambiente, como a EPA e de padronização como, *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), *Association of Analytical Communities* (AOAC) e *International Organization for Standardization* (ISO). Os testes ecotoxicológicos são classificados



consoante o período de exposição dos organismos-teste e mediante o tipo do sistema da solução-teste (Costa et al., 2008; OECD, 2006; USEPA, 2002a).

#### 2.5.1. Classificação dos testes de toxicidade segundo o critério de exposição dos organismos-teste

Os testes ecotoxicológicos podem ser classificados como agudos ou crónicos, diferenciando-se através da duração do teste relativamente ao ciclo de vida e na resposta final do organismo-teste.

##### ***Testes de toxicidade aguda***

O teste de toxicidade aguda consiste na exposição de apenas uma espécie a várias concentrações da solução-teste durante um curto período de tempo em relação ao ciclo de vida do organismo-teste. Os ensaios de ecotoxicidade aguda têm como principal objetivo calcular a concentração e/ou dose de uma substância ou composto com capacidade de produzir uma resposta específica e mensurável no organismo-teste ou população. O mais comum ponto de referência ou *endpoint* é a morte, nos testes de toxicidade aguda, embora seja comumente observado outro tipo de respostas não letais como a inibição de crescimento ou imobilização, dependendo do tipo de organismo-teste. Estes testes realizam-se num curto período de tempo, normalmente de 24h a 96h, podendo ser mais extenso, dependendo do ciclo de vida do organismo-teste.

No ecossistema aquático, os efeitos de toxicidade aguda provocado por substâncias tóxicas nos organismos aquáticos podem ser consequência de aplicações inadequadas de agrotóxicos, de derrames de substâncias tóxicas, como também a emissão de efluentes domésticos e industriais para as massas de água superficiais (Costa et al., 2008; OECD, 2000; Walker et al., 2001).

Este tipo de teste apresenta algumas limitações como: i) não é possível avaliar se a mortalidade dos organismos-teste é maior numa escala temporal do que a observada, devido ao curto período de exposição; ii) em alguns organismos após a exposição a curto e médio prazo, os efeitos não letais só ocorrem após o período de latência, e os testes agudos, com curta duração de exposição podem não abranger este período; iii) apenas uma fase do ciclo de vida do organismo é testado, a fase juvenil normalmente apresenta maior sensibilidade; iv) cada organismo-teste apresenta uma sensibilidade diferente à mesma substância, denominado de “toxicidade aguda à espécie seletiva” e uma mínima sensibilidade a efeitos não letais, que podem levar à morte por exposição prolongada (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

### ***Testes de toxicidade crónica***

Os testes de toxicidade crónica consistem na exposição do organismo-teste a várias concentrações da solução-teste por um período de ensaio, por norma superior a 96h, que pode compreender parte ou a totalidade do ciclo de vida do organismo-teste. Este tipo de teste permite avaliar os possíveis efeitos de toxicidade sobre os organismos-teste quando expostos por um intervalo de tempo prolongado a concentrações tóxicas que permitem a sobrevivência dos organismos, mas afetam as suas funções fisiológicas e biológicas, como a reprodução, crescimento, maturação, entre outras (Costa et al., 2008; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Walker et al., 2001).

Os ensaios crónicos dependem diretamente dos resultados dos ensaios de toxicidade aguda, pois as concentrações-teste não letais são calculadas a partir da  $CL_{50}$ , como a  $CE_{50}$  (concentração efetiva média). No ecossistema aquático, os efeitos de toxicidade crónica são mais frequentes, isto, devido à diluição pontual de xenobióticos, compostos que não fazem parte da composição bioquímica de um organismo, no meio aquático; aos fenómenos antagónicos e sinérgicos e à associação dos poluentes orgânicos aos sedimentos (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Devido à diluição progressiva dos compostos potencialmente tóxicos, como é o caso das águas residuais no meio recetor, maioritariamente, as amostras não relevam ou relevam apenas efeitos mínimos nos ensaios de toxicidade aguda, não demonstrando a relação entre a concentração e o efeito, o que é fundamental para a avaliação da toxicidade. Todavia, no meio recetor podem haver fenómenos de instabilidade a longo prazo no ecossistema aquático. Por isso, o aumento da exposição dos organismos é essencial para detetar o risco de variações ténues no meio aquático através de testes de ecotoxicidade (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

#### 2.5.2. Classificação dos testes de toxicidade segundo o critério de sistema da solução-teste

### ***Testes estáticos***

Nos testes estáticos, a solução-teste não é renovada durante o ensaio. Assim, os organismos-teste são expostos à mesma solução-teste inicial durante todo o período de duração do ensaio. Este tipo de teste é apropriado quando as concentrações de exposição permanecem acima de 80% do valor inicial durante o período de exposição (OECD, 2000; Walker et al., 2001). Os testes estáticos apresentam várias vantagens, como a simplicidade e baixo-custo, rentabilidade na determinação do cumprimento do valor limite de emissão, utilização limitada de recursos como a mão-de-obra, espaço, equipamento, permitindo assim, a realização de mais testes no mesmo período de tempo, como também a utilização de um menor volume de solução-teste. Porém, o teste estático apresenta algumas desvantagens, como a possível diminuição do oxigénio dissolvido (OD) que pode resultar num aumento da CQO e CBO, e em resíduos

metabólicos, a possível perda de substâncias tóxicas da adsorção e/ou volatilização nos recipientes de ensaio reduzindo assim a toxicidade aparente, tornando os testes estáticos menos sensíveis que os ensaios semi-estáticos e os dinâmicos (OECD, 2000; USEPA, 2002a).

### ***Testes semi-estáticos***

Nos ensaios semi-estáticos, a solução-teste é substituída em intervalos regulares, estando os organismos-teste expostos a uma solução-teste da mesma concentração de amostra, usualmente renovada a cada 24 horas ou a outro intervalo prescrito. Sendo os organismos-teste transferidos de um recipiente de ensaio para outro ou substituindo uma parte ou a totalidade da solução-teste (OECD, 2000; Walker et al., 2001).

Os testes semi-estáticos apresentam algumas vantagens em relação a outros sistemas, como a possibilidade de diminuição do oxigênio dissolvido na CQO e/ou CBO, ou efeitos nocivos de resíduos metabólicos dos organismos-teste; a possibilidade de perda de substâncias tóxicas através da volatilização e/ou adsorção nos recipientes de ensaio, permite também que os organismos-teste se alimentem quando se esgotam rapidamente as suas fontes de energia sempre que as soluções-teste são renovadas, mantendo os organismos num estado mais saudável. Contudo, este tipo de ensaio apresenta também desvantagens, destacando-se a exigência de um maior volume de solução-teste do que os testes estáticos e usualmente menos probabilidade de variações temporais nas propriedades dos resíduos, o que não ocorre nos testes estáticos (OECD, 2000; USEPA, 2002a).

### ***Testes dinâmicos***

Os testes dinâmicos apresentam-se como o melhor, mais complexo e dispendioso método de renovação da solução-teste (Walker et al., 2001).

São utilizados dois tipos de testes dinâmicos de uso comum, (i) a solução-teste é bombeada do ponto de amostragem diretamente para o sistema de diluição; (ii) amostras compostas são recolhidas periodicamente, colocadas num tanque adjacente ao laboratório teste e bombeadas continuamente do tanque para o sistema de diluição. O sistema dinâmico, ou de fluxo contínuo, é o método indicado para testes no campo devido ao grande volume (geralmente 400L/dia) de solução necessária. Este tipo de teste é considerado dispendioso e impraticável de realizar num laboratório. Este sistema apresenta como vantagens, o fornecimento de uma avaliação mais representativa da toxicidade aguda em relação à origem da toxicidade, especialmente se a amostra for bombeada continuamente da origem e a sua toxicidade variar com o tempo; as

concentrações de OD são mais facilmente mantidas e a possível redução da perda de substâncias tóxicas devido a fenómenos como adsorção, volatilização, absorção e degradação.

Todavia, a necessidade de grande volume de amostra e de água de diluição, a complexidade do equipamento usado no teste, a manutenção do equipamento, a necessidade de um operador a tempo inteiro enquanto decorre o teste e a complexidade de executar testes múltiplos são as principais desvantagens deste tipo de sistema em relação aos sistemas mais convencionais (OECD, 2000; USEPA, 2002a, 2002b).

### ***Parâmetros de toxicidade aguda***

Os parâmetros de avaliação da concentração letal (CL) e da concentração efetiva (CE) são normalmente utilizados para definir a toxicidade aguda. Normalmente, os parâmetros das concentrações letais e efetivas são expressos em relação a 50% dos organismos, por representar respostas mais consistentes, por ter um maior grau de confiança e são mais significativas de ser extrapoladas. A  $CL_{50}$  representa a concentração de amostra que provoca a mortalidade de 50% dos organismos-teste, em determinado tempo de exposição e condições de teste. Por sua vez, a  $CE_{50}$  representa a concentração de amostra que causa um efeito agudo, como a imobilização, a 50% dos organismos, também em determinado período de exposição e condições de teste.

O parâmetro dose letal média ( $DL_{50}$ ) representa a dose de amostra que causa a mortalidade de 50% dos organismos no período de exposição e condições de teste. A  $DL_{50}$  é normalizada pelo peso do organismo, expresso em miligramas de substância, por peso do organismo em quilogramas (Costa et al., 2008; Metcalf & Eddy, 2003).

### ***Parâmetros de toxicidade crónica***

Os resultados dos testes de toxicidade crónica são frequentemente analisados estatisticamente para determinar a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO) (Metcalf & Eddy, 2003).

O parâmetro CENO representa a maior concentração de substância que não causa efeito nocivo significativo nos organismos para um determinado período de tempo e nas condições de teste. No entanto, o parâmetro de avaliação CEO representa a menor concentração de substância-teste que causa efeito nocivo significativo nos organismos, também num determinado período de exposição e nas condições testes. Os resultados obtidos nos testes de toxicidade crónica são normalmente expressos em CENO e em CEO. Nos últimos anos, devido a desenvolvimentos científicos, o parâmetro CENO foi desvalorizado, tendo sido substituído pela concentração efetiva (CE) e pela concentração letal (CL), num intervalo de 10 a 20%. (Costa et al., 2008; Metcalf & Eddy, 2003; OECD, 2006).

### ***Aplicação dos resultados dos testes de toxicidade***

Os parâmetros  $CL_{50}$ ,  $CE_{50}$ , CENO e CEO são bastante utilizados na ecotoxicologia aquática e regularizados em função do ambiente em que os organismos estão expostos, por isso são expressos nas mesmas unidades como a concentração ambiental das substâncias ou compostos presentes no ecossistema, como miligramas por litro de solução preparada, em água sinteticamente apropriada, como água destilada. Todos os parâmetros são normalmente expressos em  $mg \cdot L^{-1}$ , mas também podem ser expressos em percentagem (Costa et al., 2008).

Os valores obtidos nos testes de toxicidade aguda e crónica, expressos nos parâmetros de avaliação supracitados, expressam uma relação inversa à toxicidade, ou seja, quanto menor o valor obtido, expresso em  $mg \cdot L^{-1}$ , maior é a toxicidade da substância ou composto em estudo.

Os parâmetro CENO e CEO, como foi referido anteriormente, têm vindo a ser substituídos pelos parâmetros CE, no intervalo de 10 a 20%, e pelo parâmetro de concentração de inibição (CI) que foi introduzido para caracterizar efeitos nos testes de toxicidade crónica (Costa et al., 2008; Metcalf & Eddy, 2003; OECD, 2006).

#### **2.5.3. Tipo de organismos-teste**

Os testes ecotoxicológicos consistem na medição da resposta dos organismos expostos a determinadas concentrações da solução-teste em relação a um controlo. Têm sido utilizados gradualmente em alguns países para estabelecer os níveis de toxicidade de várias substâncias-alvo e matrizes aquosas complexas, como as águas residuais domésticas e industriais, as águas superficiais recetoras, nos organismos aquáticos inseridos em diferentes níveis tróficos. Os organismos-teste integrados nos testes ecotoxicológicos incluem várias espécies representativas de diferentes níveis tróficos como as microalgas e plantas aquáticas, bactérias, invertebrados e peixes. Os vários organismos permitem uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crónicos das diferentes substâncias e compostos potencialmente tóxicos no meio recetor. A sensibilidade dos organismos face às diferentes substâncias pode ser detetada de várias formas, como a nível bioquímico, fisiológico, morfológico e comportamental. Todavia, diferentes organismos-teste podem apresentar diferente sensibilidade não só entre diferentes espécies como também na mesma espécie, em fatores como o sexo, fase de desenvolvimento, nível nutricional e características genéticas, assim como, aos fatores ambientais como o pH, luminosidade e temperatura que têm influência bastante significativa no desenvolvimento dos organismos (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Rizzo, 2011; Tothill & Turner, 1996). A escolha do organismo-teste é regida por critérios de seleção de espécies como a sua abundância e disponibilidade, representação ecológica significativa, a sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares, bem como a

sua estabilidade genética e uniformidade das populações, a sua sensibilidade constante, o seu baixo custo e a sua rapidez de cultivo em laboratório (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Tendo em conta todas estas características necessárias à escolha do organismo-teste, existem vários seres vivos padronizados, que também devem ser representativos do meio aquático em estudo. No entanto, não existe nenhuma espécie de organismo que represente na totalidade todos os efeitos das várias substâncias presentes no meio recetor. Deste modo, foi criado um método apropriado para avaliar o risco de toxicidade no meio recetor utilizando uma bateria de testes ecotoxicológicos com organismos representativos dos diferentes níveis tróficos. A sua aplicabilidade permite uma avaliação mais completa do risco de toxicidade das águas residuais (Hernando et al., 2005; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

### ***Bactérias***

As bactérias são organismos que podem estar presentes no ecossistema aquático. Apesar dos testes ecotoxicológicos utilizarem organismos como as algas, plantas aquáticas, crustáceos e peixes, estes requerem maior tempo de exposição com a solução-teste e necessitam de um maior volume de amostra do que os testes ecotoxicológicos que utilizam bactérias (Costa et al., 2008). Entre outras desvantagens dos testes ecotoxicológicos que utilizam algas, plantas aquáticas, crustáceos e peixes, destacam-se problemas com a padronização dos organismos, requisitos para equipamentos específicos, operadores especializados e falta de reprodutibilidade (Parvez et al., 2006).

Os ensaios ecotoxicológicos utilizando as bactérias são avaliados em cinco categorias, como o crescimento populacional, consumo do substrato, respiração, luminescência de ATP e ensaios de inibição de bioluminescência. Estes testes ecotoxicológicos são bastante requisitados, isto porque as bactérias são organismos presentes na maioria dos ecossistemas, os testes de ecotoxicidade são relativamente rápidos (com tempo de exposição entre 15 a 30 minutos) e simples. As espécies utilizadas como organismos-teste nos ensaios de inibição de bioluminescência incluem *Vibrio fischeri* (Figura 2.1) (precedentemente designada por *Photobacterium phosphoreum*), *Vibrio harveyi* e *Pseudomonas fluorescens*, enquanto os organismos utilizados nos ensaios ecotoxicológicos por inibição metabólica, envolvem as espécies *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida* (Costa et al., 2008; Parvez et al., 2006).

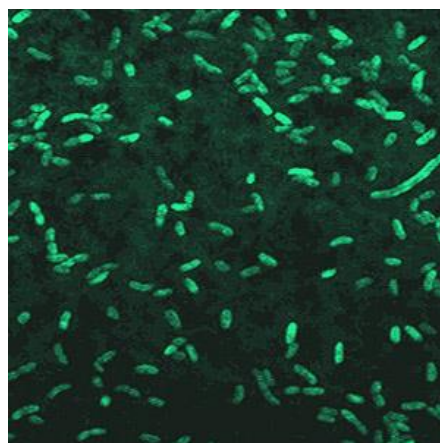


Figura 2.1- *Vibrio fischeri* Fonte: Microbelog, (2012)

### **Alga**

A aplicação das algas como bioindicador nos testes ecotoxicológicos é importante pois, como produtores primários, situam-se na base da cadeia trófica e qualquer variação na atividade destes organismos tem efeitos precursores nos níveis tróficos superiores do ecossistema aquático. As espécies de algas de água doce mais utilizadas em testes de ecotoxicidade são *Chlorella vulgaris* (Figura 2.2), *Scenedesmus subspicatus* e *Raphidocelis subcapitata*, pois apresentam taxas de crescimento elevadas e são facilmente cultivadas em laboratório (Costa et al., 2008). O tempo de duração dos testes é bastante curto, necessitando de um tempo de contacto com a substância-teste de 72 a 96 horas, para observar o efeito de inibição no crescimento das algas, comparando com os controlos. As condições standardizadas que devem ser controlados durante todo o período de ensaio são, a temperatura na faixa de 21 a 24°C, com variação máxima de  $\pm 2$  °C em espécies não tropicais, o pH do meio de cultura não deve aumentar mais de 1,5 unidades durante o teste e a intensidade luminosa deve estar compreendida entre 60 e 120  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , (Costa et al., 2008; OECD, 2011).

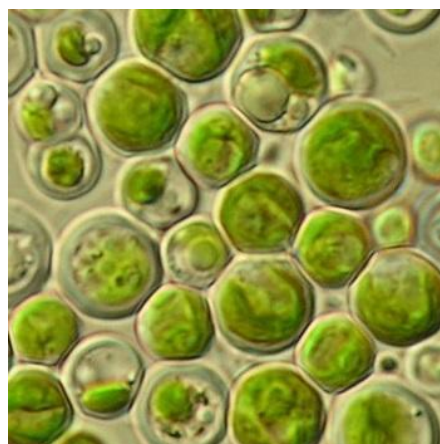


Figura 2.2- *Chlorella vulgaris* Fonte: Algae Research Supply, (2018)

## ***Plantas Aquáticas***

As plantas aquáticas, tal como as algas, também são um bioindicador de carácter relevante, pois são de produtores primários. Qualquer alteração na sua atividade pode ter efeitos sobre os níveis tróficos superiores da teia alimentar. Os testes ecotoxicológicos realizados com as plantas aquáticas apresentam variadas vantagens, como alta taxa de reprodução (gerando organismos geneticamente idênticos), baixo custo de manutenção, pequena dimensão e necessitam de pouco espaço em laboratório (Appenroth et al., 2013).

Estes organismos são caracterizados pelo elevado número de parâmetros de avaliação, como o tempo de duplicação, peso seco ou peso húmido e como também a medição da área foliar e a contagem do número de frondes (OECD, 2006).

As plantas aquáticas também têm a capacidade de remover metais pesados e nutrientes como o fósforo e azoto do meio aquático. As plantas mais utilizadas nos testes ecotoxicológicos pertencem ao género *Lemna*, sendo as espécies *Lemna minor* (Figura 2.3) e *Lemna gibba* (Figura 2.4) que apresentam inúmeros estudos sobre o efeito de uma elevada quantidade de substâncias tóxicas (Cheng & Stomp, 2009; OECD, 2006). Estas espécies reproduzem-se assexuadamente, através da formação de novas frondes na região da bolsa reprodutiva da fronde, tendo algumas espécies deste género um tempo de duplicação de dois dias, sob condições padronizadas. Estas propriedades levam a que o género *Lemna* seja utilizado em várias aplicações além dos testes ecotoxicológicos, como na remoção de nutrientes de águas residuais, na produção de etanol, na alimentação animal e humana e no uso posterior como fertilizante de culturas agrícolas em substituição dos fertilizantes químicos (Appenroth et al., 2013).

Os testes de inibição de crescimento, usando as espécies do género *Lemna*, foram padronizados e comercializados por várias organizações como OECD e ISO. Os testes de inibição do crescimento das espécies do género *Lemna* têm como objetivo quantificar os efeitos relacionados com as substâncias potencialmente tóxicas no crescimento vegetativo ao longo de um período de exposição com base em avaliações de várias medições, como o número de frondes, peso húmido, peso seco ou área foliar total. A cultura das espécies do género *Lemna*, em crescimento exponencial, é colocada em diferentes concentrações de substância-teste durante o período de tempo específico do teste. Uma das desvantagens apontadas na utilização deste tipo de organismo é o período de tempo até se verificar alterações no crescimento. Os testes ecotoxicológicos utilizando plantas aquáticas têm sido utilizados para avaliar a toxicidade de contaminantes orgânicos e inorgânicos, como sedimentos, resíduos sólidos e matrizes complexas, como as águas residuais domésticas e industriais (Appenroth et al., 2013; Rizzo, 2011).





Figura 2.3- *Lemna minor*



Figura 2.4- *Lemna gibba* Fonte: Aphotoflora, (2006)

### ***Invertebrados***

Os invertebrados são bastante utilizados na avaliação da toxicidade de substâncias e compostos potencialmente tóxicos, principalmente em matrizes complexas como as águas residuais. O organismo mais utilizado na caracterização da toxicidade na água é o crustáceo *Daphnia magna* (Figura 2.5) porque existe uma grande quantidade de informação sobre esta espécie, desde as técnicas de cultura até às condições de crescimento, além de existirem inúmeros estudos sobre o efeito de uma grande quantidade de substâncias tóxicas sobre esta espécie (Costa et al., 2008; Rizzo, 2011). Esta espécie, normalmente chamada de pulga de água, pertencente ao género *Daphnia*, à ordem *Cladocera* e são organismos planctónicos caracterizados por apresentarem antenas torácicas achatadas usadas para produzir uma corrente e assim capturarem as partículas em suspensão na água, para sua alimentação.

Esta espécie tem elevada importância nas cadeias alimentares aquáticas e é uma fonte significativa de alimento para peixes e outros predadores invertebrados. Estes crustáceos possuem um ciclo de vida relativamente curto, apresentam sensibilidade a várias substâncias presentes no ambiente e necessitam de menores volumes de solução-teste do que os testes

ecotoxicológicos com microalgas e peixes, devido à sua pequena dimensão. As organizações internacionais EPA, ISO, OECD, *Environment Canada* e ASTM (*American Society for Testing and Materials*) desde 1984 estabeleceram e padronizaram testes de toxicidade aguda e crónica para a espécie *Daphnia magna*, pois apresentam características como o ciclo de vida curto, fácil manuseamento, elevada e rápida reprodução, além de apresentarem sensibilidade a muitas substâncias potencialmente tóxicas (Costa et al., 2008; Ebert, 2005; Tatarazako & Oda, 2007).



Figura 2.5- *Daphnia magna* Fonte: FCT-UNL, (2009)

### **Peixes**

Os peixes são os principais representantes dos consumidores secundários nas cadeias tróficas do ecossistema aquático. O propósito dos testes ecotoxicológicos agudos utilizando peixes, é avaliar o possível risco de toxicidade em espécies semelhantes no meio ambiente, que pode dever-se à descarga de efluentes domésticos e industriais no meio recetor (Costa et al., 2008; Rizzo, 2011). As espécies mais comuns nos testes de ecotoxicidade são *Oncorhynchus mykiss* (Figura 2.6), normalmente conhecida como truta arco-íris e *Lepomis macrochirus* (Figura 2.7), uma vez que são espécies indicadoras particularmente sensíveis e apresentam uma vasta informação científica que permitiu caracterizar a resposta a contaminantes ambientais (Rizzo, 2011; USEPA, 1996). Normalmente, os testes ecotoxicológicos utilizando peixes como organismo-teste apresentam boa sensibilidade às substâncias potencialmente tóxicas e permitem análise em tempo real. No entanto, estes testes ecotoxicológicos apresentam algumas desvantagens como problemas de padronização, requerem maior tempo de exposição, exigem equipamentos específicos e operadores especializados (Farré & Barceló, 2003; Rizzo, 2011).



Figura 2.6- *Oncorhynchus mykiss* Fonte: Fish World, (2010)



Figura 2.7- *Lepomis macrochirus* Fonte: Bclegg, (2016)

## 2.6. Caracterização da estação de Tratamento de águas residuais de Fernão Ferro

### 2.6.1. Considerações gerais

As águas residuais que afluem à ETAR de Fernão Ferro são constituídas por águas residuais do tipo doméstico, provenientes da freguesia de Fernão Ferro, concelho do Seixal. Encontra-se em funcionamento desde 1988, tendo sido posteriormente ampliada, com o objetivo de aumentar a capacidade da infraestrutura e melhorar a operacionalidade e eficácia de tratamento, assim como melhorar a qualidade do efluente.

A ETAR de Fernão Ferro apresenta capacidade de tratamento instalada para um caudal de 5890 m<sup>3</sup>/dia correspondendo a cerca de 32 700 habitantes. Além da infraestrutura, a ETAR possui cerca de 10 quilómetros de emissários e duas estações elevatórias. Este efluente após sofrer tratamento adequado é descarregado no rio Judeu que desagua no estuário do rio Tejo.



Figura 2.8- ETAR de Fernão Ferro Fonte: SIMARSUL, (2006)

### 2.6.2. Descrição do sistema de tratamento da ETAR de Fernão Ferro

O sistema de tratamento adotado na ETAR de Fernão Ferro (Figura 2.8) possui duas linhas de tratamento, à exceção da etapa de decantação primária. No que se refere à fase líquida, o sistema de tratamento abrange um tratamento preliminar constituído por obra de entrada (Figura 2.10), em que a receção das águas residuais brutas é feita numa caixa para retenção de sólidos grosseiros, equipada com uma garra bivalve e uma gradagem manual de 50 mm seguida de duas linhas com um sistema de pré-tratamento, constituído por um sistema compacto de tamisação, remoção de areias, óleos e gorduras (desarenador/desengordurador). Posteriormente os gradados

e areias são colocados em contentores e enviados para o destino final apropriado, o aterro sanitário. As gorduras são encaminhadas posteriormente para o tratamento da fase sólida.

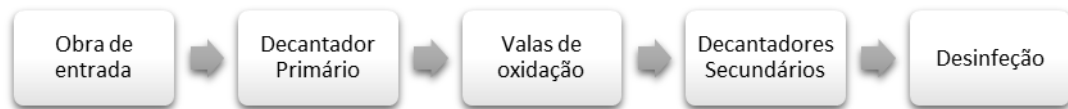


Figura 2.9- Esquema de tratamento da fase líquida da ETAR de Fernão Ferro

O efluente segue para o tratamento primário, onde é elevado através de 2(+1) bombas de poço seco para o decantador primário, onde ocorre a remoção dos sólidos de menor dimensão que ainda subsistem no caudal afluente e a remoção parcial da matéria orgânica (Figura 2.11).



Figura 2.10- Obra de entrada



Figura 2.11- Decantador primário

Na fase do tratamento secundário, o efluente é conduzido para o tratamento secundário assegurado por duas valas de oxidação (Figura 2.12), onde a oxigenação é proporcionada por dois arejadores de superfície de eixo vertical, precedidos por tanque de contacto (*selector*) com três agitadores. A etapa de decantação secundária é composta por duas linhas de tratamento.



A ETAR dispõe ainda de tratamento terciário, em que o efluente passa por uma etapa de desinfecção, anteriormente garantida por dois canais com lâmpadas ultravioleta (UV) de baixa pressão, alto rendimento e limpeza automática.

Parte de água residual tratada é reutilizada como água de serviço na ETAR, existindo para o efeito um reservatório de água residual tratada sob os canais de UV e um grupo hidropressor.



Figura 2.12- Valas de oxidação



Figura 2.13- Decantador secundário

Na fase sólida (Figura 2.14), o tratamento das lamas geradas do tratamento primário e do tratamento biológico é assegurado por um espessador gravítico, seguido de digestão anaeróbia a frio das lamas espessadas em dois digestores (Figura 2.15), e desidratação mecânica das lamas digeridas em duas centrífugas (Figura 2.16). O armazenamento das lamas desidratadas é feito num silo de lamas com eventual adição de cal. Relativamente ao biogás produzido no processo de digestão de lamas é encaminhado para o gasómetro, que procede à sua queima, sem produção de energia.



Figura 2.14- Esquema de tratamento da fase sólida da ETAR de Fernão Ferro



Figura 2.15- Digestor de lamas



Figura 2.16- Centrifuga

A ETAR de Fernão Ferro possui também um sistema de desodorização na zona de pré-tratamento, desidratação e espessamento constituída por dois biofiltros com lavagem a montante.



Figura 2.17- Gasómetro.

É descrito de forma estruturada a sequência das operações unitárias que o sistema de tratamento da fase líquida e da fase sólida da ETAR de Fernão Ferro (Pinheiro, 2011).



A fase líquida é constituída por:

- Câmara de chegada, com respetivo *by-pass* (1 linhas);
- Caixa de retenção de sólidos grosseiros com garra bivalve e gradagem grossa (50 mm) com limpeza manual (1 linha);
- Tamisação, remoção de areias, óleos e gorduras (desarenador/desengordurador) (2 linhas);
- Elevação inicial (1 linha – 2(+1) bombas);
- Medidor de caudal a tratar (1 linha);
- Decantação primária em decantador de planta circular (1 linha);
- Tanque de contacto (*seletors*) (2 linhas);
- Reatores biológicos por lamas ativadas em valas de oxidação (2 linhas);
- Decantação secundária em decantadores de planta circular (2 linhas);
- Recirculação de lamas (2x 1 (+1) bombas) (1 linha);
- Desinfecção em canal UV (2 linhas);
- Medidor de caudal tratado (1 linha);
- Reservatório para água de serviço (1 linha).

Na fase sólida:

- Descarga gravítica e temporizada das lamas primárias (1 linha);
- Elevação das lamas biológicas em excesso (2x1(+1) bombas) (1 linha);
- Espessamento gravítico das lamas mistas (1 linha);
- Digestão anaeróbia a frio das lamas mistas espessadas (2 linhas);
- Desidratação mecânica de lamas em centrífugas (2 linhas);
- Estabilização das lamas com adição de cal (1 linha);
- Armazenamento de lamas estáveis em silo (1 linha).

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Metodologia geral de ensaio

A ecotoxicidade da água residual de origem doméstica foi determinada através do teste de inibição do crescimento para plantas aquáticas das espécies *Lemna minor* e *Lemna gibba*, segundo a metodologia descrita na norma da OECD nº221, adaptada a 26 de abril de 2006.

O teste ecotoxicológico consiste na exposição de *L. minor* a diferentes concentrações previamente estabelecidas de água residual doméstica, durante um período de ensaio de 7 dias, avaliando durante este período a inibição de crescimento da *L. minor*, espécie escolhida para este teste.

O objetivo do teste de inibição de crescimento da planta aquática *L. minor* da norma OECD, é avaliar e quantificar os efeitos potencialmente tóxicos da água residual doméstica, no crescimento vegetativo durante o período do ensaio com base na avaliação de diversos parâmetros de avaliação. O parâmetro de avaliação principal é a medição do número de frondes, sendo necessário escolher pelo menos mais um parâmetro de avaliação, a área foliar ou peso seco e/ou peso húmido, pois, algumas substâncias-teste têm a capacidade de afetar outros parâmetros de avaliação do que apenas o número de frondes.

Antes de iniciar o ensaio ecotoxicológico com a água residual, procedeu-se a um teste de referência, em que o organismo-teste é sujeito a uma substância de referência tóxica, como o dicromato de potássio, de modo a atender os critérios de controlo de qualidade (OECD, 1999).

A fim de quantificar os efeitos da água residual doméstica no crescimento de *L. minor*, o seu crescimento foliar em várias concentrações de água residual é comparado com o controlo, permitindo assim a determinação da concentração causadora da inibição específica do crescimento em percentagem, sendo expressada em CE, como por exemplo CE<sub>50</sub>.

A área foliar total apresenta vantagens em consideração com outros parâmetros de avaliação, pois pode ser determinada para cada recipiente-teste e controlos no início, meio e no final do teste, enquanto outros parâmetros apenas podem ser medidas no início e fim do teste. Para a validação do teste o tempo de duplicação das frondes deve ser menor que 2,5 dias (60 horas) e a taxa média de crescimento específico igual ou superior a 0,275 dias<sup>-1</sup>.

A norma da OECD obriga a que todo o material em contacto com a substância de teste deva ser de vidro ou de outro material quimicamente inerte. Estes devem ser livres de contaminantes químicos e esterilizados. Os recipientes devem ser largos o suficiente para permitir o crescimento da planta, sendo o volume mínimo da solução-teste de 100 mL. Se a *L. minor* for recolhida no seu habitat natural, as plantas devem ser mantidas em cultura no mesmo meio do controlo durante um período de oito semanas, antes de se iniciar o teste.

A cultura deve estar visivelmente livre de contaminação por outros organismos, como algas e protozoários. A qualidade e a uniformidade das plantas devem ser garantidas, pois terão um impacto significativo no resultado do teste. Assim, as plantas preferenciais para o teste devem ser jovens, de crescimento rápido, não descoloradas e sem lesões visíveis, no mínimo com duas

frondes, pois um elevado número de frondes únicas pode ser indicador de stresse ambiental, como falta de nutrientes, intensidade luminosa e temperatura. É recomendada a utilização do meio nutriente modificado *Swedish standard* (SIS) no cultivo e no controlo do teste utilizando a *L. minor*. O meio nutriente *Steinberg* modificado também é adequado.

No teste de ecotoxicidade devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações e pelo menos devem ser utilizadas três réplicas em cada concentração. O número de réplicas deve ser pelos menos três em cada concentração-teste e controlo. A *L. minor* deve conter entre duas a quatro plantas quando transferidas para os recipientes teste e deve conter entre nove a doze frondes. Em cada recipiente-teste deve ser colocado o mesmo número de plantas e frondes.

O ensaio pode decorrer em regime estático, semi-estático ou dinâmico, devendo ser fornecida iluminação fluorescente branca quente ou fria contínua com uma intensidade luminosa entre 6500 a 10000 lux e a uma temperatura de  $24 \pm 2^\circ \text{C}$ . O pH do meio nutriente do controlo não deve aumentar 1,5 unidades durante o teste, no entanto se o desvio for superior a 1,5 unidades não invalida o teste se os outros critérios de validação forem cumpridos. O valor de pH deve ser medido no início e no final do ensaio, caso se utilize o teste estático.

As amostras de água residual bruta e tratada foram caracterizadas, tendo sido analisados os seguintes parâmetros, como CQO, SST, fósforo total e azoto *Kjeldahl* (orgânico e amoniacal), parâmetros estes possíveis de provocar toxicidade.

### 3.2. Parâmetros de avaliação

O principal objetivo deste estudo é avaliar a inibição do crescimento da *L. minor*, segundo a norma da OECD nº221, medido através dos seguintes parâmetros de avaliação como o número de frondes (folhas) e área foliar no início, numa fase intermédia e final do ensaio. Foi também medido o pH das várias concentrações da substância-teste e controlos.

Os efeitos das substâncias-teste no crescimento vegetativo de *L. minor* são avaliados através das variáveis-resposta, taxa de crescimento média específica e *yield*, segundo a norma da OECD nº 221.

A taxa de crescimento média específica é calculada com base nas alterações logarítmicas do número de frondes e da área foliar, ao longo do ensaio, no grupo de tratamento e nos controlos, usando a equação abaixo:

$$\% Ir = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

Onde:

% Ir: percentagem de inibição da taxa de crescimento média específica;

$\mu C$ : valor médio para  $\mu$  no controlo;

$\mu T$ : valor médio para  $\mu$  no grupo de tratamento

A variável-resposta %  $I_{yield}$  é calculada com base nas alterações do número de frondes e da área foliar, nos controlos e grupos de tratamento até à finalização do teste de inibição, segundo a equação em baixo:

$$\% I_y = \frac{(bc - br)}{bc} \times 100$$

Onde:

%  $I_y$ : percentagem de redução em *yield*;

*bc*: biomassa final menos a biomassa inicial para o grupo de controlo;

*br*: biomassa final menos a biomassa inicial para cada grupo de tratamento.

Os valores de inibição de crescimento entre as duas variáveis não são comparáveis, pois a taxa de crescimento média específica é baseada no padrão de crescimento exponencial de *L. minor*, em que a toxicidade é calculada no efeito sobre a taxa de crescimento, independentemente da taxa de crescimento média específica dos controlos ou duração do teste. Já os resultados obtidos através de *yield* dependem de todas estas variáveis. Por isso, a aplicação da taxa de crescimento média específica para determinar a toxicidade é cientificamente preferível do que os valores de toxicidade baseadas em *yield*.

### 3.2.1. Número de frondes

O número de frondes (folhas) inicial, na fase intermédia e final foi avaliado através do comando de contagem de partículas do programa *ImageJ* (National Institutes of Health, 2018), que através do processamento da imagem permitiu delimitar a circularidade das partículas e o tamanho mínimo das partículas a serem contadas (Figura 3.1). Também, foi verificada a veracidade de contagem de partículas, comparando os valores obtidos através do programa com a contagem feita pelo operador, apresentando um erro máximo de 10%.

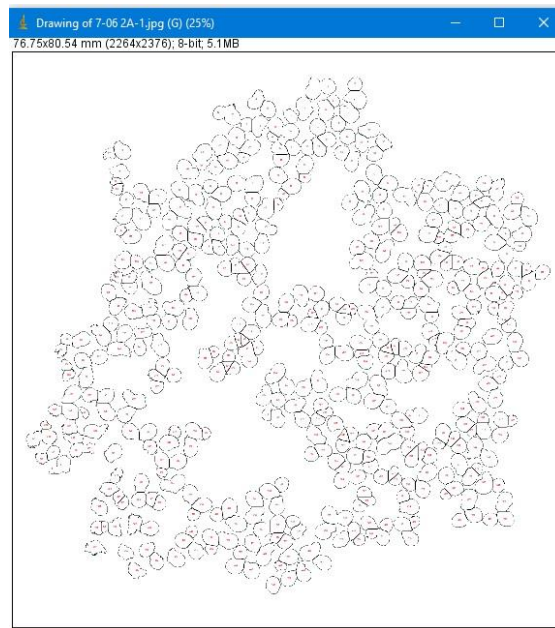


Figura 3.1- Contagem do número de frondes através do programa *ImageJ*

### 3.2.2. Área foliar

A área foliar, também foi calculada através do programa de processamento de imagem *ImageJ*, em que a imagem foi processada através de vários comandos para o cálculo da área foliar de cada fronde. O programa delimita todas as frondes (Figura 3.1), e partindo de uma escala predefinida, calcula a área total de cada fronde (Figura 3.2).

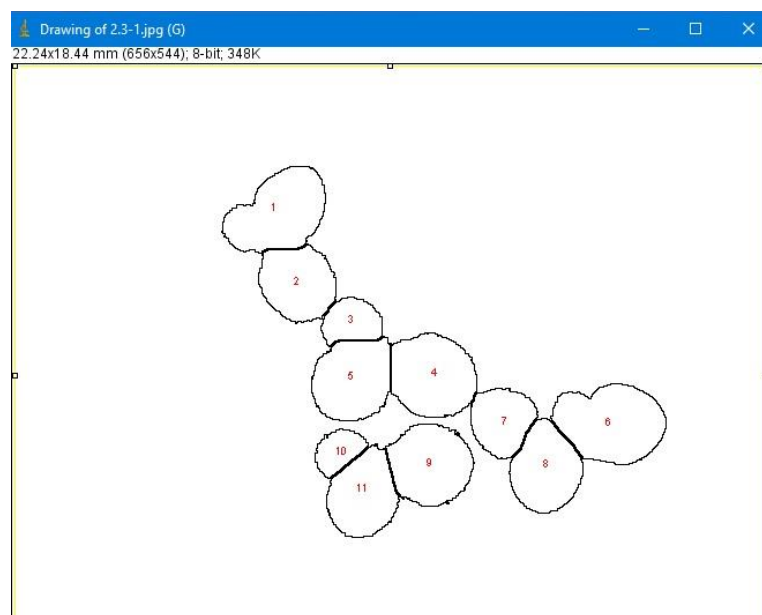


Figura 3.2- Delimitação do número de frondes no programa *ImageJ*

### 3.3. Organismo-Teste

O organismo-teste utilizado foi a macrófita aquática *L. minor*, devido à sua fácil manutenção, crescimento rápido e baixo custo, ou até gratuito, se recolhida no seu habitat natural. A macrófita foi recolhida num poço numa zona rural localizada na freguesia e concelho de Almeirim, Portugal. Após ser recolhida, foi isolada e mantida em condições recomendadas pela norma nº221 da OECD (OECD, 2006) e foi identificada como *Lemna minor* (Palhinha, 1939). A espécie apresenta frondes pequenas de 2 a 3 milímetros e pouco convexas na face interior. Segundo Palhinha (1939), *L. minor* está presente apenas durante os meses de Fevereiro a Outubro e distribui-se por quase todo o território de Portugal Continental.



Figura 3.3- Isolamento da cultura *L. minor*

#### 3.3.1. Meio nutriente

O meio de cultura utilizado na manutenção da cultura, nos testes de referência e no teste de ecotoxicidade foi o meio de *Steinberg* modificado, bastante adequado para o crescimento de *L. minor*. O meio *Steinberg* modificado foi preparado a partir de 8 soluções-stock, com composição e concentrações indicadas na Tabela 3.1, utilizando água desionizada na diluição. Todas as soluções-stock foram autoclavadas a 121°C durante 20 minutos para esterilização, exceto a solução 8 que apenas foi adicionada após a autoclavagem. O pH do meio de cultura foi corrigido para  $5,5 \pm 0,2$  como preconizado pela norma.

Tabela 3.1- Composição e respectivas concentrações do meio nutriente Fonte: OECD, (2006)

<b>Substância</b>	<b>Meio nutriente</b>
<b>Macronutrientes</b>	<b>g/L</b>
<b>solução stock 1</b>	
KNO <sub>3</sub>	17,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5
<b>solução stock 2</b>	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5
<b>solução stock 3</b>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	14,75
<b>Micronutrientes</b>	<b>mg/L</b>
<b>solução stock 4</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120
<b>solução stock 5</b>	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	180
<b>solução stock 6</b>	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	44
<b>solução stock 7</b>	
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180
<b>solução stock 8</b>	
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	760
EDTA	1 500

### 3.4. Amostragem da água residual

As amostras de água residual doméstica bruta e tratada, recolhidas na ETAR de Fernão Ferro, foram recolhidas no dia 12 de julho de 2018 pelas 10 horas. A água residual bruta foi recolhida na obra de entrada e a água residual tratada no fim da linha de tratamento, sendo ambas acondicionadas em recipientes, que depois de recolhidos foram mantidos na câmara frigorífica à temperatura de 4º C. Os testes ecotoxicológicos foram efetuados no dia seguinte à amostragem e caracterizada nos primeiros dias após a recolha, para a determinação dos parâmetros, destacando-se CQO, SST, fósforo total e azoto *Kjeldahl*.

### 3.5. Substância de referência

Inicialmente foi realizado um ensaio com a substância inibidora de referência, o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) com grau de pureza superior a 98%, de modo a demonstrar a validade e a precisão das condições utilizadas nos ensaios. O dicromato de potássio é utilizado como substância de referência, i) devido ao seu efeito no crescimento da *L. minor* estar bem documentado, ii) as soluções *stock* podem ser preparadas sem utilizar agentes solubilizantes iii) e por apresentar estabilidade durante o período de ensaio de sete dias (OECD, 1999). No primeiro

teste de referência foram utilizadas seis concentrações teste de 0,7 mg.L<sup>-1</sup> a 30 mg.L<sup>-1</sup>. No segundo teste de referência também foram utilizadas 6 concentrações no intervalo de 0,125mg.L<sup>-1</sup> a 4 mg.L<sup>-1</sup>. Em ambos os testes foi utilizado meio de cultura para a diluição para solubilizar o dicromato de potássio. As concentrações utilizadas no teste com o dicromato de potássio foram sugeridas pelo teste interlaboratorial (*Ring-Test*) da OECD, em que vários laboratórios submeteram *L. minor* a diferentes concentrações da substância de referência tóxica afim de calcular a CE<sub>50</sub> (OECD, 1999).

#### 3.5.1. Procedimento experimental do teste de referência

O ensaio de referência consistiu em expor *L. minor* em fase de crescimento exponencial a diferentes concentrações de dicromato de potássio e nas condições predefinidas pela norma.

O ensaio consistiu em adicionar a erlenmeyer's de 250 mL, diferentes volumes da substância-teste, aferindo o volume de 100 mL com meio nutriente. Adicionou-se posteriormente 12 frondes uniformes em cada recipiente, tendo sido tapados com algodão cardado e gaze hidrófila, de modo a haver trocas gasosas. Todas as concentrações-teste e controlo foram mantidas a uma temperatura de 24 ± 2°C e iluminação fluorescente uniforme contínua do tipo branca fria, a uma intensidade luminosa de 6,5 KLux, durante um período de ensaio de sete dias. As diferentes concentrações-teste e controlos foram colocados de forma aleatória, para minimizar a influência das diferenças espaciais na intensidade luminosa e temperatura. Procedeu-se a dois testes de referência com o dicromato de potássio, um entre as concentrações de 0,7 a 30 mg.L<sup>-1</sup> e outro entre as concentrações de 0,125 a 4 mg.L<sup>-1</sup>. Os parâmetros de avaliação, número de frondes e área foliar, foram medidos no início, a meio e no fim do teste.

### 3.6. Efluente-teste

A substância-teste utilizada neste estudo foi a água residual bruta e tratada de origem doméstica. Neste estudo pretende-se avaliar a toxicidade da água residual com a *Lemna minor*. Foram utilizadas cinco concentrações-teste para água residual bruta e também para a água residual tratada, testando-se concentrações de efluente entre 6,25% e 100% (sem diluição), utilizando-se como meio de diluição para ambas águas residuais, a água ultrapura, utilizando sistema de purificação Milli-Q® Integral 3, e utilizando meio de cultura *Steinberg* modificado apenas no controlo. A principal diferença no procedimento entre a realização de testes de inibição de crescimento de *L. minor* com apenas uma substância e uma amostra de efluente, diz respeito à preparação das soluções-teste. Quando se testam produtos químicos, por norma são dissolvidas diferentes quantidades da substância a testar no meio de cultura para criar uma série de concentrações mas no caso dos efluentes não é exequível porque i) pode ser necessário testar 100% da amostra e ii) se a amostra for diluída apenas com meio de cultura, a concentração de



nutrientes seria diferente entre concentrações. Portanto a diluição das águas residuais para os testes de ecotoxicidade foi feita com água ultrapura.

#### 3.6.1. Procedimento experimental do teste de inibição de crescimento de *L. minor*

O teste de inibição do crescimento de *Lemna minor* L, ocorreu com as mesmas condições de ensaio que o teste de referência. As concentrações da água residual bruta e tratada utilizadas no teste de inibição do crescimento da *L. minor* foram de 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. Todas as condições preestabelecidas no teste de ecotoxicidade encontram-se discriminadas na Tabela 3.2.



Figura 3.4- Instalação do teste de ecotoxicidade com as águas residuais em condições controladas

Tabela 3.2- Resumo das condições preestabelecidas no teste de ecotoxicidade.

<b>Critério</b>	<b>Condição</b>
<b>Tipo de teste</b>	estático
<b>Temperatura ( °C)</b>	24 ± 2
<b>Intensidade luminosa (Klux)</b>	6,5
<b>Características da iluminação</b>	luz fluorescente branca fria
<b>Fotoperíodo</b>	iluminação contínua
<b>Recipiente Teste</b>	erlenmeyer's de 250 mL
<b>Volume de solução-teste</b>	100 mL
<b>Nº de frondes por recipiente</b>	12
<b>Concentrações Testadas</b>	5 (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%) e 1 controle
<b>Nº de réplicas</b>	3 (solução-teste) e 6 (controle)
<b>Duração do teste (dias)</b>	7
<b>Parâmetros de avaliação</b>	número de frondes e área foliar
<b>Amostragem</b>	início, meio e fim do teste

### 3.7. Caracterização físico-química da água residual

Antes da iniciação dos testes de ecotoxicidade em água residual bruta e tratada procedeu-se à sua caracterização. As caracterizações das águas residuais devem ocorrer no menor espaço de tempo entre a recolha e a caracterização, para evitar a degradação dos componentes dissolvidos.

#### 3.7.1. CQO

O teor de matéria orgânica foi determinada através da carência química de oxigénio (CQO). O método baseia-se numa ebulição com refluxo, em que o excesso de dicromato de potássio foi titulado com uma solução de sulfato de ferro (II) e amónia, na presença do indicador ferroína (A.P.H.A., 1998).

#### 3.7.2. Sólidos suspensos totais

A determinação dos sólidos suspensos totais (SST) foi realizada através de uma filtração em vácuo, com um volume de amostra de 25 mL e 50 mL para a água residual bruta e tratada, respetivamente, foi seco em estufa a 105 ° C durante 2 horas e posteriormente arrefecido em exsiccador e pesado (A.P.H.A., 1998).

### 3.7.3. Azoto Kjeldahl

O método *Kjeldahl* permite determinar o azoto orgânico e o azoto amoniacal em simultâneo. As amostras foram digeridas e depois destiladas, utilizando um destilador semiautomático *VELP SCIENTIFICA UDK 139* para libertar todo o amoníaco. Posteriormente, o amoníaco foi quantificado através de titulação (A.P.H.A., 1998).

### 3.7.4. Fósforo Total

A concentração de fósforo total foi determinada através do método de espectrofotometria de absorção molecular com comprimento de onda de 800 nm, através do espectrofotómetro *Camspec M501 Single Beam UV/ Vis* (A.P.H.A., 1998).

## 3.8. Análise de resultados

As análises dos dados foram feitas como descrito em Moreira et al., (2017). Assim, depois da verificação da normalidade (teste Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste de Levene), os valores de CE<sub>50</sub> foram calculados através da regressão não-linear utilizando a curva logística de três parâmetros no software Sigma Plot 11.0 (Systat, 2008).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Isolamento e crescimento da cultura *L. minor*

O trabalho inicial efetuado teve como objetivo isolar a *L. minor* e estabelecer a sua cultura com crescimento exponencial.

A curva de crescimento representada na Figura 4.1 corresponde ao ensaio de crescimento realizado no período inicial (primeiras quatro semanas) de *L. minor* às condições standardizadas pela norma n.º 221 da OECD (OECD, 2006).

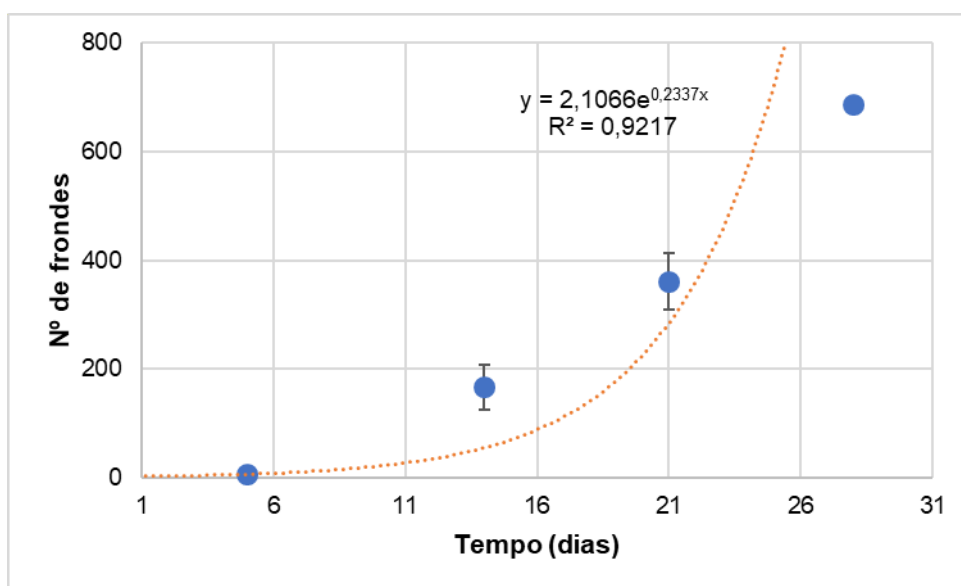


Figura 4.1- Curva de crescimento médio de *L. minor* em condições padronizadas

Da análise da Figura 4.1 pode-se referir que a *L. minor* apresentou um crescimento exponencial entre 1 a 28 dias, tendo-se adaptado facilmente ao meio da cultura por não ter apresentado uma fase de adaptação.

Na Figura 4.2 pode-se observar que até aos 21 dias do crescimento de *L. minor*, as plantas com apenas uma fronde eram mais comuns, possivelmente devido à adaptação da espécie às condições preestabelecidas. Após este período, as plantas com três frondes começaram a ser mais comuns, o que indica uma boa adaptação de *L. minor* às condições da cultura. As plantas que apresentam entre duas a três frondes demonstram uma boa adaptação ao meio, uma vez que um elevado número de plantas com apenas uma fronde pode ser indicador de *stress* ambiental (Appenroth et al., 2013). Como as macrófitas não cobriam totalmente a superfície do meio da cultura, as microalgas desenvolveram-se significativamente. Para evitar esta competição das microalgas por luz e nutrientes com a *L. minor*, procedeu-se à substituição do meio da cultura a cada três dias, o que reduziu o crescimento das microalgas.

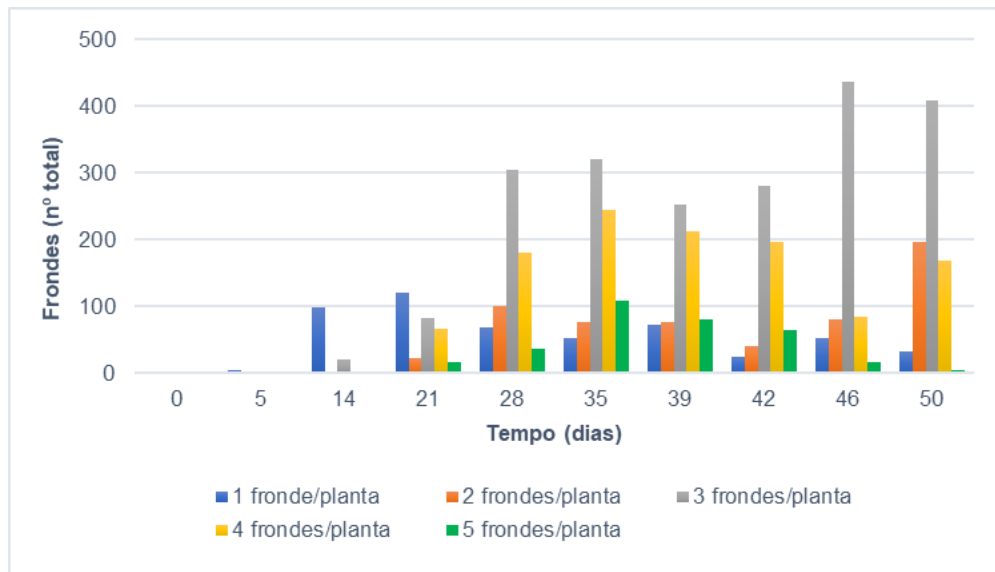


Figura 4.2- Número de frondes de *L. minor* ao longo do tempo

Assim, os resultados obtidos neste ensaio permitem comprovar a capacidade de adaptação da macrófita às condições padronizadas pela norma.

A partir do 28º dia o crescimento exponencial da *L. minor* diminuiu, tendo oscilado entre o 35º e 50º dia (Figura 4.3). Neste período, tentou-se perceber a razão desta oscilação, tendo-se verificado que havia um defeito no luxímetro e que a intensidade luminosa era somente cerca de 3000 lux. Adicionalmente, como a temperatura ambiente aumentou, a temperatura no laboratório passou para valores superiores a 26º C. Como consequência, as plantas apresentaram maior dificuldade de adaptação às novas condições de ensaio, não relevando crescimento exponencial.

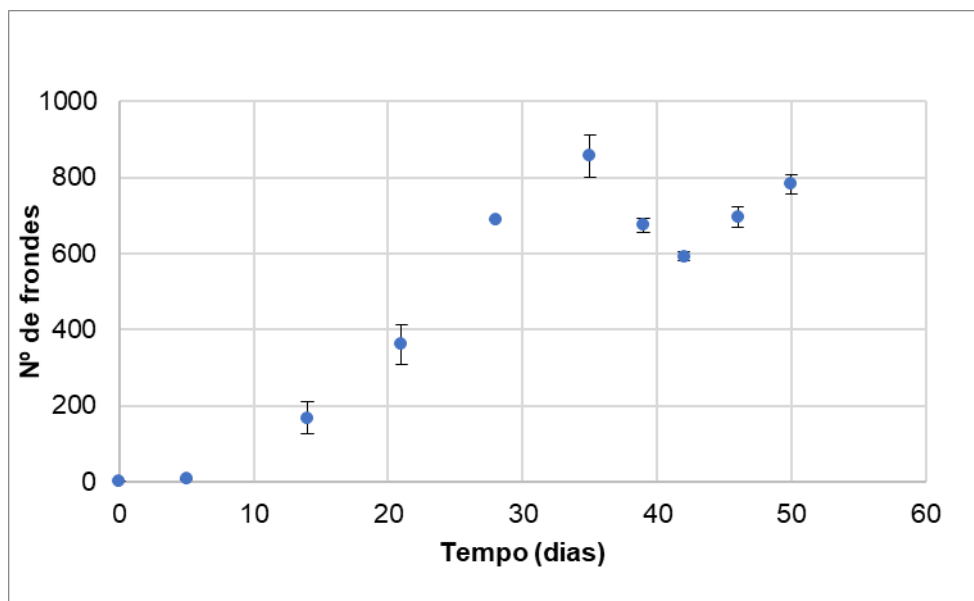


Figura 4.3- Crescimento médio de *L. minor* ao longo do ensaio

O aumento de temperatura e a baixa intensidade luminosa, influenciaram o crescimento da macrófita *L. minor*, como também permitiram a proliferação das algas (Figura 4.4). A alteração das condições de crescimento padronizadas permitiu verificar que a variação de temperatura e de intensidade luminosa não se mostravam favoráveis ao crescimento exponencial de *L. minor*.

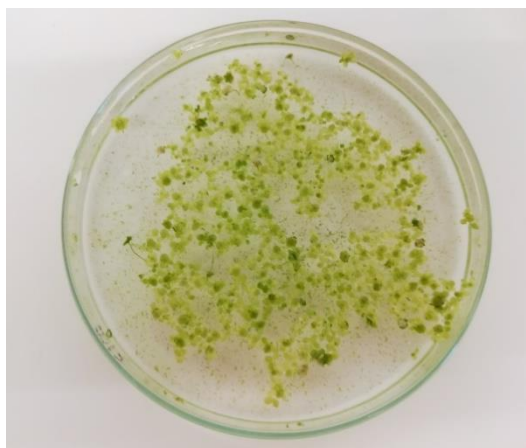


Figura 4.4- Aspeto da cultura *L. minor* (contaminação por algas)

Vários autores têm demonstrado a influência dos fatores ambientais no crescimento de *Lemna* spp., particularmente da temperatura, da iluminância e do pH para um crescimento ótimo da macrófita *L. minor* (Hillman, 1961; Hillman et al., 1978; Ziegler et al., 2015). A temperatura ideal ao crescimento de *L. minor* encontra-se na faixa de 22-26°C, o pH na faixa 5-9, e a faixa de intensidade luminosa entre 6500-10000 Lux (Cheng & Stomp, 2009; Hillman et al., 1978; OECD, 2006).

Subsequentemente, os fatores foram corrigidos para os valores padronizados pela norma nº221 da OECD, com um aumento da intensidade luminosa aproximadamente de 6500 Lux e refrigerando a sala onde se encontrava a cultura para uma temperatura de cerca de 24°C, através de um aparelho de ar condicionado.

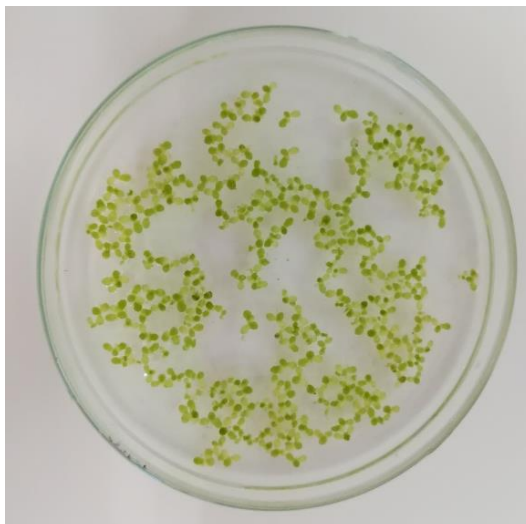


Figura 4.5- Aspeto de *L. minor* após a correção dos fatores ambientais (isenta de algas).

Com estas alterações, *L. minor* retomou o crescimento exponencial a partir do dia 42 (Figura 4.3) e a contaminação por algas foi controlada, não havendo a presença de algas (Figura 4.5).

Não obstante todos os condicionalismos indicados, mas tendo em conta as condições no isolamento da cultura *L. minor*, salienta-se que a taxa de crescimento da macrófita apenas foi válida para o teste de inibição de crescimento de *L. minor* em efluentes, o que não ocorreu no teste referência.

No que diz respeito ao pH, o valor de pH ideal para *L. minor* é de 5,5, não tendo havido durante o teste oscilações superiores a 1,5 unidades, como exigido pela norma para os controlos.

#### 4.2. Teste de referência com o dicromato de potássio

Nas Figura 4.6 e Figura 4.7 encontra-se representada a inibição do crescimento do número de frondes de *L. minor* e a inibição do crescimento da área foliar de *L. minor* em função da concentração de dicromato de potássio, respetivamente.

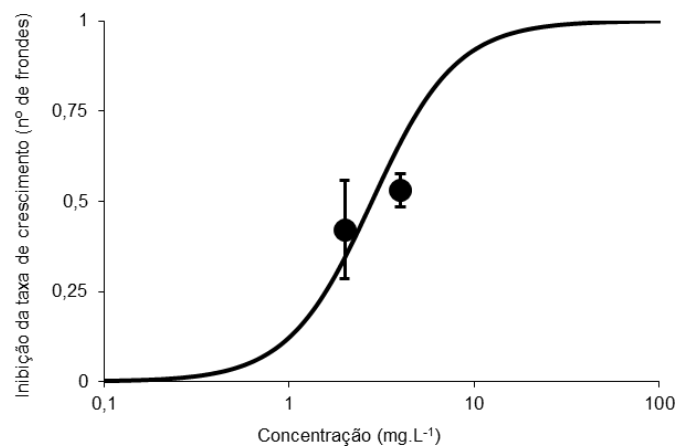


Figura 4.6- Inibição da taxa de crescimento específico do nº de frondes de *L. minor* em função da concentração de dicromato de potássio

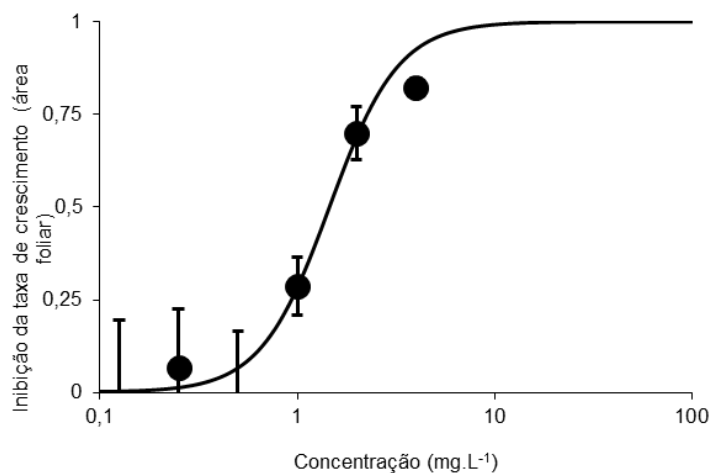


Figura 4.7- Inibição da taxa de crescimento específico da área foliar de *L. minor* em função da concentração de dicromato de potássio

Na Figura 4.6 apenas são representados dois valores, isto é, apenas são representadas as duas maiores concentrações testadas (2 e 4 mg. L<sup>-1</sup>). As quatro concentrações mais baixas testadas não apresentaram inibição no número de frondes, mas surpreendentemente um aumento do número de frondes em relação ao controlo. Este fenómeno é conhecido como efeito *hormesis*, uma resposta adaptativa das células ou organismo a stresse moderado, provocado por baixas concentrações de substância potencialmente tóxica (Mattson, 2008).

Os resultados em relação ao parâmetro *yield*, para o número de frondes e área de crescimento média específica não se encontram representados graficamente, porque estes parâmetros foram similares.

Durante o teste de referência com o dicromato de potássio foi possível observar uma elevada inibição das algas tanto nas concentrações mais baixas como nos controlos (Figura 4.8).





Figura 4.8- Fim do teste de referência com dicromato de potássio

As concentrações utilizadas para o teste de referência com dicromato de potássio foram escolhidas a partir do teste de comparação interlaboratorial (*Ring-Test*) da OECD (OECD, 1999). O primeiro teste de referência com o dicromato de potássio, com concentrações entre 0,7- 30 mg.L<sup>-1</sup>, demonstrou que a gama de concentração do dicromato de potássio não era ideal, pois provocou a necrose e clorose de *L. minor* durante o teste. Este intervalo foi escolhido porque ainda não tinha sido feita a identificação da espécie. Como outras espécies do género *Lemna* são menos sensíveis ao dicromato de potássio, decidiu-se assim incluir uma gama de concentrações-teste mais elevadas.

Após a identificação da espécie como *L. minor*, procedeu-se à repetição do teste de referência e foi escolhida uma gama de concentração de dicromato de potássio inferior (0,125 a 4 mg. L<sup>-1</sup>), de modo a calcular CE<sub>50</sub>.

Na Tabela 4.1 encontram-se os valores relativos ao CE<sub>50</sub> obtidos no teste de referência com o dicromato de potássio, com o respetivo intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4.1- Resumo dos valores de CE<sub>50</sub> obtidos no teste de ecotoxicidade com dicromato de potássio, com o respetivo intervalo de confiança de 95%

Parâmetro de avaliação	CE <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
Nº de frondes - <i>Yield</i>	3,24 (1,76-4,73)
Nº de frondes – Taxa de crescimento média específica	2,81 (1,73-3.89)
Área Foliar - <i>Yield</i>	1,47 (0.84-2.09)
Área Foliar – Taxa de crescimento média específica	1,47 (0.84-2.09)

Foi calculada a taxa de crescimento média específica,  $\mu$ , para verificar se o crescimento de *L. minor* ocorria de modo exponencial durante o teste, como é exigido pela norma para que o teste de ecotoxicidade seja válido. A taxa de crescimento obtida no teste de referência foi de 0,161 dia<sup>-1</sup>, sendo valor mínimo indicado pela norma para a taxa de crescimento é de 0,275 dia<sup>-1</sup>, não sendo assim possível validar o teste de referência.

Os valores obtidos de CE<sub>50</sub> para o parâmetro de avaliação número de frondes, nas variáveis-resposta *yield* e taxa de crescimento média específica, foram as concentrações de 3,24 e 2,81 mg.L<sup>-1</sup>, respetivamente (Tabela 4.1).

A CE<sub>50</sub> obtida para o parâmetro de avaliação número de frondes-taxa de crescimento média específica está de acordo com os valores obtidos em vários laboratórios, no teste de comparação interlaboratorial de OECD (*Ring-Test*). O intervalo típico de CE<sub>50</sub> indicado pela OECD é de 2 a 4 mg.L<sup>-1</sup>, mas apesar deste intervalo, os valores de CE<sub>50</sub> nos vários laboratórios que participaram no *Ring-Test* variam entre 1,1 e 29,2 mg.L<sup>-1</sup> (OECD, 1999).

No parâmetro área foliar, a CE<sub>50</sub>, para cada variável resposta, é 1,47 mg.L<sup>-1</sup> para *yield* e 1,47 mg.L<sup>-1</sup> para a taxa de crescimento média específica. A CE<sub>50</sub> no parâmetro de avaliação área foliar coincidentemente teve o mesmo valor de concentração. A OECD defende que os valores de CE<sub>50</sub> na taxa de crescimento média específica são normalmente superiores aos resultados obtidos em *yield* (OECD, 2006).

Estas diferenças entre *yield* e a taxa de crescimento média específica não podem ser interpretadas como uma diferente sensibilidade entre as duas variáveis resposta, dado que os valores são matematicamente distintos (OECD, 2006). Porém, isto não foi possível demonstrar neste ensaio, pois os valores de *yield* foram iguais ou comparáveis aos da taxa de crescimento média específica.

#### 4.3. Teste de inibição de crescimento de *L. minor* em água residual doméstica

##### 4.3.1. Caracterização da água residual

Os resultados obtidos na caracterização analítica das águas residuais brutas e tratadas da ETAR de Fernão Ferro, em comparação com os valores limite emissão segundo a legislação vigente, DL nº236/98 (Tabela 4.2).

Tabela 4.2- Resultados obtidos da análise ao efluente bruto e tratado da ETAR de Fernão Ferro, comparativamente aos valores limite de emissão (VLE)

Parâmetros	Água residual bruta	Água residual tratada	VLE
pH	7,66	7,69	6,0-9,0
CQO (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	1246	32	150
SST (mg.L <sup>-1</sup> )	637	6	60
P <sub>total</sub> (mgP.L <sup>-1</sup> )	15	6,5	10
N <sub>Kjeldahl</sub> (mgN.L <sup>-1</sup> )	123	36	1

<sup>1</sup> O Decreto-Lei n.º 236/98A legislação vigente não apresenta VLE para este parâmetro.

A qualidade da água residual bruta apresenta grande diferença em relação à água residual tratada, em relação aos parâmetros analisados (Tabela 4.2) como era expectante.

Todos os parâmetros analisados para a água residual tratada estão dentro dos VLE.

##### 4.3.2. Toxicidade da água residual doméstica bruta

Os resultados dos testes de ecotoxicidade com a água residual doméstica bruta e tratada com a macrófita *L. minor* apresentam evidências de efeitos agudos (mortalidade), como a redução do número de frondes e da área foliar.

Para validação do teste de ecotoxicidade com os efluentes, foi calculada a taxa de crescimento média específica,  $\mu$ , para verificar se o crescimento de *L. minor* ocorria de modo exponencial durante o teste, como é exigido pela norma para que o teste de ecotoxicidade seja válido. A taxa de crescimento obtida no teste com os efluentes foi de 0,361 dia<sup>-1</sup>, respetivamente, sendo valor mínimo indicado pela norma para a taxa de crescimento é de 0,275 dia<sup>-1</sup>, sendo assim o teste válido.

Na Tabela 4.3 estão representados os valores relativos à CE<sub>50</sub> obtidos no teste de ecotoxicidade com água residual bruta, com o respetivo intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4.3- Resumo dos valores de CE<sub>50</sub> obtidos no teste de ecotoxicidade com água residual bruta, com o respetivo intervalo de confiança de 95%

Parâmetro de avaliação	CE <sub>50</sub> (%)
Nº de frondes - <i>Yield</i>	4,60 (1,07-8,12)
Nº de frondes – Taxa de crescimento média específica	11,21 (8,86-13,57)
Área Foliar - <i>Yield</i>	9,58 (3,17-16,00)
Área Foliar – Taxa de crescimento média específica	9,58 (3,17-16,00)

Todas as concentrações de água residual doméstica bruta tiveram efeitos negativos sobre o crescimento de *L. minor*, observando-se clorose e necrose nas frondes.

Os valores obtidos no ensaio de ecotoxicidade da água residual bruta apresentam elevadas inibições de crescimento de *L. minor* (Figura 4.9). Para número de frondes, *yield* e a taxa de crescimento média específica, obtiveram-se valores de CE<sub>50</sub> de 4,6% e 11% da água residual bruta, respetivamente. Portanto, o valor de percentagem da água residual bruta obtido para a taxa de crescimento média específica, é superior ao valor de percentagem obtido para *yield*, como era previsto pela OECD (OECD, 2006), conforme discutido anteriormente.

Esta tendência não foi observada para área foliar, em que a CE<sub>50</sub> foi de 9,6% para ambos os parâmetros. Porém, todos os resultados indicam que uma percentagem de água residual bruta reduzida apresenta elevada toxicidade em *L. minor*.

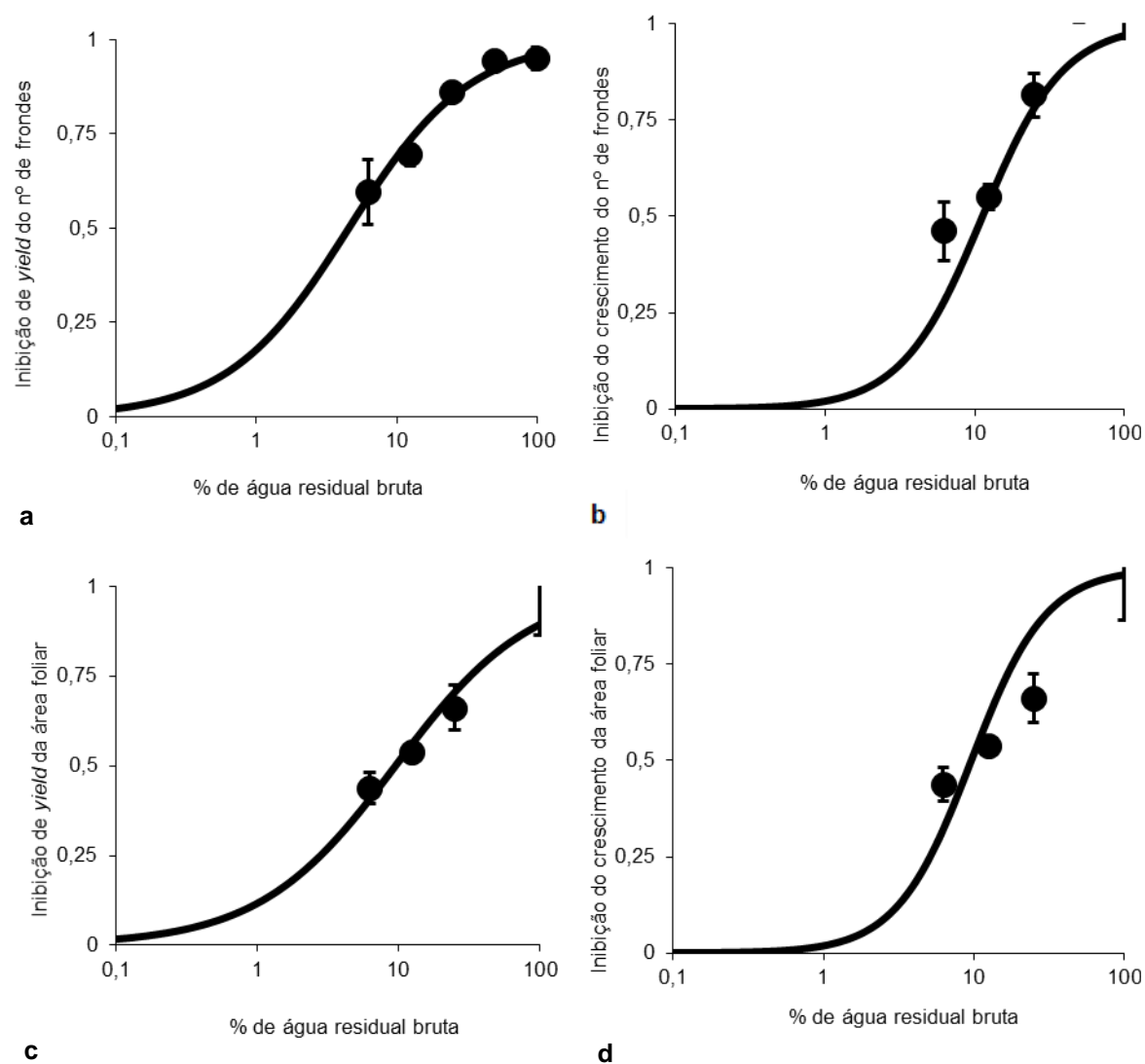


Figura 4.9- Inibição de crescimento de *L. minor* em função da percentagem de água residual bruta em **a)** *yield* e em **b)** taxa de crescimento média específica, no parâmetro número de frondes e inibição de *yield* de *L. minor* em função da percentagem de água residual bruta em **c)** *yield* e em **d)** taxa de crescimento média específica, no parâmetro área foliar

#### 4.3.3. Toxicidade da água residual tratada

Na Tabela 4.4 estão representados os valores obtidos de  $CE_{50}$  do teste de ecotoxicidade da água residual tratada, com o respetivo intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4.4- Resumo dos valores de CE<sub>50</sub> obtidos no teste de ecotoxicidade com água residual tratada, com o respetivo intervalo de confiança de 95%

Parâmetro de avaliação	CE <sub>50</sub> (%)
Nº de frondes - <i>Yield</i>	4,95 (-1,88-11,78)
Nº de frondes – Taxa de crescimento média específica	25,62 (24,08-27,16)
Área Foliar - <i>Yield</i>	26,48 (24,07-27,50)
Área Foliar – Taxa de crescimento média específica	25,79 (24,07-27,50)

Os resultados obtidos no ensaio de ecotoxicidade de *L. minor* com a água residual tratada apresentam elevadas inibições de crescimento (Figura 4.10). Obtiveram-se valores de CE<sub>50</sub> de 5% e 26% para o número de frondes para os parâmetros *yield* e taxa de crescimento, respetivamente. Os valores de CE<sub>50</sub> calculados para o número de frondes indicam elevada inibição para o crescimento da macrófita. Para a área foliar, os valores de CE<sub>50</sub> são 27% e 26% de água residual tratada, para *yield* e taxa de crescimento média específica, respetivamente.

Os resultados indicam que a água residual tratada apresenta elevada inibição de crescimento da macrófita *L. minor*, apesar da toxicidade da água residual bruta apresentar maior toxicidade para a macrófita *L. minor*. Todavia, os resultados obtidos na água residual tratada têm maior importância, pois é nesta condição que é descarregada para o meio recetor aquático.

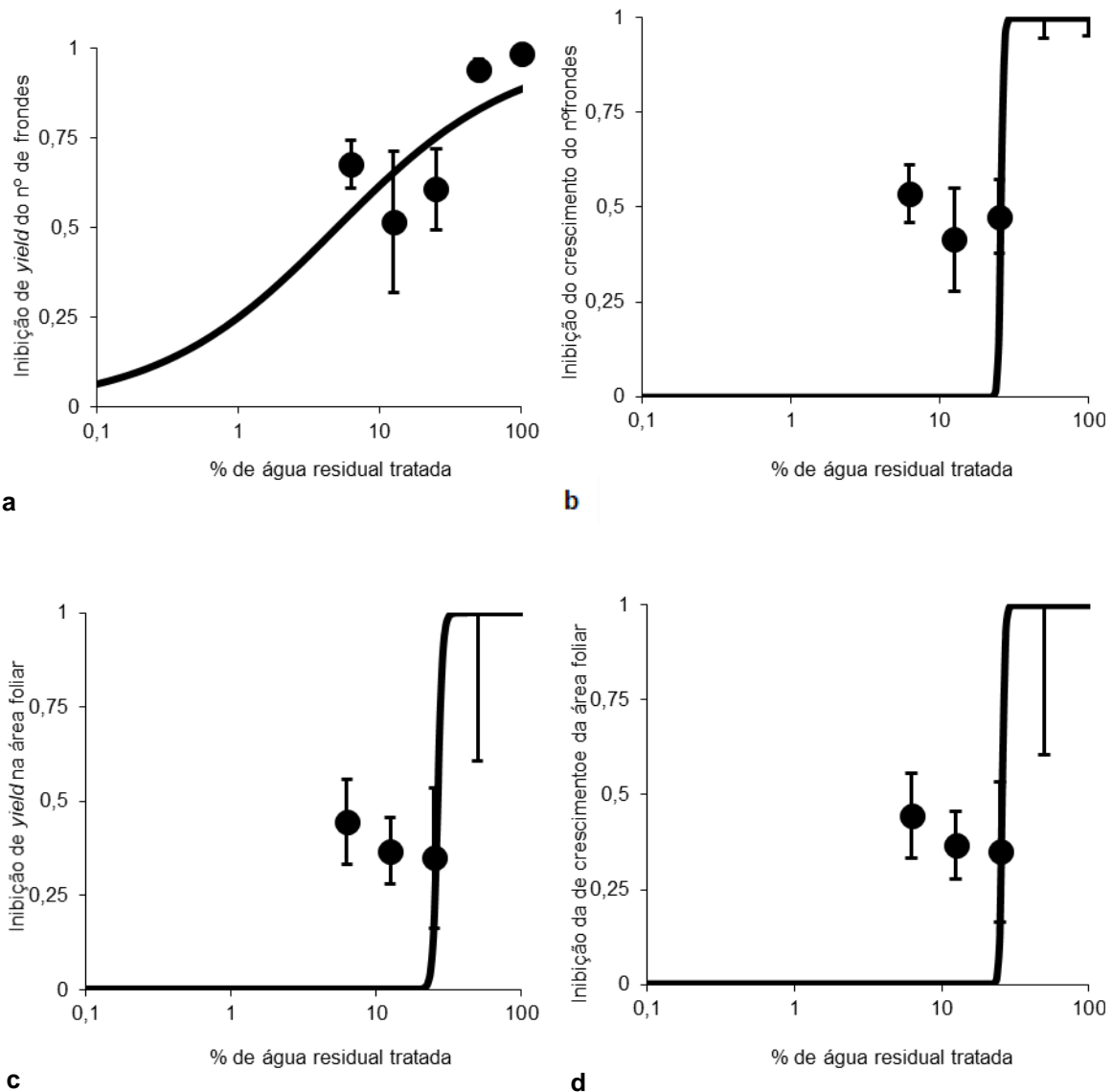


Figura 4.10- Inibição de crescimento de *L. minor* em função da percentagem de água residual tratada em **a)** *yield* e em **b)** taxa de crescimento média específica, no parâmetro número de frondes e inibição de *yield* de *L. minor* em função da percentagem de água residual tratada em **c)** *yield* e em **d)** taxa de crescimento média específica, no parâmetro área foliar

No entanto, os valores obtidos no teste de ecotoxicidade com *L. minor* a água residual bruta e tratada podem-se considerar um caso pontual, pois tem de se ter em conta que a água residual tratada vai ser diluída no corpo de água recetor, portanto o risco não será tão elevado como indicado nos testes de toxicidade com a água residual tratada. Do mesmo modo, tem de se ter em consideração que o efluente não foi recolhido a várias horas do dia, pois uma única amostragem do efluente não pode indicar se o efluente apresenta toxicidade ou não. Não sendo assim possível indicar se o grau de tratamento da ETAR de Fernão Ferro é suficiente para evitar o impacto ambiental no meio recetor aquático.

## 5. Conclusões e perspectivas de trabalhos futuros

Este estudo demonstrou o potencial da macrófita flutuante *L. minor* como bioindicador de toxicidade numa água residual doméstica.

Na fase inicial do trabalho isolou-se a *L. minor* e estabeleceu-se a cultura com crescimento exponencial entre o 1º e 28º dia, demonstrando assim uma fácil adaptação ao meio de cultura. Após o 28º dia observou-se que o crescimento de *L. minor* diminuiu, como consequência da diminuição da intensidade luminosa e do aumento da temperatura ambiente, o que contribuiu para que a temperatura do laboratório atingisse valores superiores a 26º C, dificultando a adaptação das plantas às novas condições de ensaio e o que originou uma diminuição do crescimento de *L. minor*. Subsequentemente, os fatores foram corrigidos para os valores preestabelecidos pela norma OECD, com um aumento da intensidade luminosa e diminuição da temperatura, retomando novamente o crescimento exponencial. No entanto, a taxa de crescimento no teste de referência foi inferior ao valor indicado pela OECD para validação do teste, já no teste de inibição de crescimento de *L. minor* em efluentes, a taxa de crescimento foi superior ao valor exigido pela norma, havendo assim validação do teste.

Face aos resultados obtidos nos testes com os efluentes, pode-se concluir que a água residual bruta em pequenas concentrações inibe o crescimento da *L. minor*. Apesar da água residual ter sido tratada na ETAR, a água residual tratada apresentou uma toxicidade só ligeiramente inferior à da água residual bruta. Por exemplo, o valor de CE<sub>50</sub> obtido para a taxa de crescimento específica média da área foliar para a água residual bruta e tratada eram 9,58% e 25,79%, respetivamente. Apesar desta toxicidade, os valores dos parâmetros físico-químicos da água residual tratada determinados não ultrapassaram os VLE. Assim este estudo demonstra a necessidade de se efetuarem testes ecotoxicológicos em complemento aos parâmetros exigidos pelo DL nº236/98.

Os ensaios de ecotoxicidade utilizando a macrófita *L. minor* demonstraram ser uma ferramenta útil, económica e de fácil implementação em relação a outros organismos-teste.

Nesta dissertação foi apenas estudado o potencial da macrófita *L. minor* como bioindicador de toxicidade em água residual doméstica bruta e tratada. No meio aquático recetor dos efluentes tratados, existem muitas outras espécies de macrófitas e de outros grupos taxonómicos. Como estas espécies podem ter uma sensibilidade maior do que a *L. minor*, recomenda-se fazer testes de ecotoxicologia com uma bateria de organismos-teste de diferentes níveis tróficos para a mesma água residual. Adicionalmente, seria importante avaliar o potencial risco de outras águas residuais urbanas para além de águas residuais industriais.



## 6. Referências Bibliográficas

- A.P.H.A. (1998). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (20th ed). Washington, DC: American Public Health Association.
- Algae Research Supply. (2018). Algae culture of *Chlorella vulgaris* used for science fair projects. Retrieved August 10, 2018, from <https://algaeresearchsupply.com/products/algae-culture-chlorella-vulgaris>
- Allan, I. J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G. A., Roig, B., & Gonzalez, C. (2006). A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta*, 69(2 SPEC. ISS.), 302–322. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.043>
- APA. (2006). Diretiva-Quadro da Água (DQA). Retrieved August 3, 2018, from <http://www.apambiente.pt/dqa/index.html>
- Aphotoflora. (2006). *Lemna gibba* - Fat Duckweed. Retrieved August 10, 2018, from [http://www.aphotoflora.com/images/lemnaceae/lemna\\_gibba\\_fat\\_duckweed\\_plants\\_24-09-06\\_2.jpg](http://www.aphotoflora.com/images/lemnaceae/lemna_gibba_fat_duckweed_plants_24-09-06_2.jpg)
- Appenroth, K. J., Borisjuk, N., & Lam, E. (2013). Telling duckweed apart: Genotyping technologies for the *Lemnaceae*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2013.00001>
- Bclegg. (2016). Male bluegill. Retrieved August 10, 2018, from [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e3/Bluegill\\_-\\_Lepomis\\_macrochirus\\_from\\_Rend\\_Lake%2C\\_IL.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e3/Bluegill_-_Lepomis_macrochirus_from_Rend_Lake%2C_IL.jpg)
- Bundschuh, M. (2014). The Challenge: Chemical and ecotoxicological characterization of wastewater treatment plant effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(11), 2407. <https://doi.org/10.1002/etc.2713>
- Bundschuh, M., & Schulz, R. (2011). Population response to ozone application in wastewater: An on-site microcosm study with *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Ecotoxicology*, 20(2), 466–473. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0599-z>
- Bundschuh, M., Zubrod, J. P., Seitz, F., Stang, C., & Schulz, R. (2011). Ecotoxicological evaluation of three tertiary wastewater treatment techniques via meta-analysis and feeding bioassays using *Gammarus fossarum*. *Journal of Hazardous Materials*, 192(2), 772–778. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.079>
- Chen, Q., Jin, Y., Zhang, G., Fang, Y., Xiao, Y., & Zhao, H. (2012). Improving production of bioethanol from duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. *Energies*, 5(8), 3019–3032. <https://doi.org/10.3390/en5083019>
- Cheng, J. J., & Stomp, A. M. (2009). Growing Duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. *Clean - Soil, Air, Water*, 37(1), 17–26. <https://doi.org/10.1002/clen.200800210>
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R., & Espindola, E. L. G. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7), 1820–1830.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>

- De Stefano, L. (2010). Facing the water framework directive challenges: A baseline of stakeholder participation in the European Union. *Journal of Environmental Management*, 91(6), 1332–1340. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.02.014>
- Decisão n.º 2455/2001/CE de 20 de Novembro. (2001). Decisão que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Diretiva. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, 4(81), 1–5.
- Declaração de Rectificação n.º 11-A/2006 de 23 de Fevereiro. (2006). Declaração de Rectificação da Lei n.º 58/2005, de 29 de Dezembro, que aprova a Lei da Água. *Diário Da República: I Série*, (128), 4350.
- Declaração de Rectificação n.º 20-AT/2001, 30 de Novembro de 2001. (2001). Declaração de Rectificação do Decreto-Lei n.º 243/2001. *Diário Da República: I Série*, (11), 7666.
- Decreto-Lei n.º 130/2012 de 22 de junho. (2012). Reestruturação do atual quadro institucional das águas. *Diário Da República: I Série*, 3109–3139.
- Decreto-Lei n.º 133/2015 de 13 de julho. (2015). Procede à sétima alteração ao Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho, que transpõe a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de maio, relativamente ao tratamento de águas residuais urbanas. *Diário Da República: I Série*.
- Decreto-Lei n.º 152/97 de 19 de Junho. (1997). Transposição para o direito interno a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de Maio de 1991, relativamente ao tratamento de águas residuais urbanas. *Diário Da República: I Série*, Nº 139, 2959–2967. Retrieved from <https://dre.pt/application/file/a/365412>
- Decreto-Lei n.º 172/2001 de 26 de Maio. (2001). Altera o Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de Junho (transpõe para o direito interno a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de Maio, relativo ao tratamento de águas residuais urbanas), transpondo para o direito interno a Diretiva n.º 98/15/CE, da Com. *Diário Da República: I Série*, 3112–3113.
- Decreto-Lei n.º 198/2008 de 8 de Outubro. (2008). Terceira alteração ao Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de Junho, que transpõe para o direito interno a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de Maio, relativamente ao tratamento de águas residuais urbanas. *Diário Da República: I Série*, 195(1.ª série), 594–606. Retrieved from [http://www.oern.pt/documentos/legislacao/d\\_dl\\_dr/DL198\\_2008.pdf%5Chttps://dre.pt/application/dir/pdf1sdip/2008/10/19500/0713007133.pdf](http://www.oern.pt/documentos/legislacao/d_dl_dr/DL198_2008.pdf%5Chttps://dre.pt/application/dir/pdf1sdip/2008/10/19500/0713007133.pdf)
- Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto. (1998). Regulamentação da qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. *Diário Da República: I Série*, 176, 3676–3722. Retrieved from <https://dre.pt/application/dir/pdf1sdip/1998/08/176A00/36763722.pdf>
- Decreto-Lei n.º 245/2009 de 22 de Setembro. (2009). Estabelecimento do regime de utilização dos recursos hídricos, determinando que toda a utilização privativa carece de um título de utilização a ser emitido por uma administração de região hidrográfica (ARH). *Diário Da República: I Série*, 2008–2009.
- Decreto-Lei n.º 261/99 de 7 de julho. (1999). Altera o Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de Junho, com

- a redacção que lhe foi dada pelo Decreto-Lei n.º 348/98, de 9 de Novembro, que transpõem para o direito interno, respectivamente, as Directivas n.os 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de Maio, e 98/15/CE, d. *Diário Da República: I Série*.
- Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto. (2007). Regulação da qualidade da água utilizada para consumo humano. *Diário Da República: I Série*, (164), 5747–5765.
- Decreto-Lei n.º 348/98 de 9 de Novembro. (1998). Procede à transposição para o direito interno da Diretiva n.º 98/15/CE, da Comissão, de 21 de Fevereiro, que altera a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de Maio, no que respeita a determinados requisitos estabelecidos no seu anexo I. *Diário Da República: I Série*, 5982–5983.
- Decreto-Lei n.º 60/2012 de 14 de março. (2012). Transposição da Diretiva nº 2009/31/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de abril, e estabelecimento do regime jurídico da atividade de armazenamento geológico de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). *Diário Da República: I Série*, 1153–1172. Retrieved from <http://dre.pt/pdf1sdip/2012/03/05300/0115301172.pdf>
- Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro. (2000). Diretiva-Quadro da Água. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, (7), 1–72.
- Diretiva 2006/11/CE de 15 de Fevereiro. (2006). Diretiva relativa à poluição causada por determinadas substâncias perigosas lançadas no meio aquático da Comunidade. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, 2006, 52–59.
- Diretiva 2008/32/CE de 11 de Março. (2008). Quadro de acção comunitária no domínio da política da água, no que diz respeito às competências de execução atribuídas à Comissão. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, (81), 60–61.
- Diretiva 2013/39/UE de 12 de agosto. (2013). Diretiva que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, 2013(226), 1–17.
- Diretiva n.º 91/271/CEE de 21 de Maio. (1991). Diretiva relativa ao tratamento de águas residuais urbanas. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, 40–52.
- Drost, W., Matzke, M., & Backhaus, T. (2007). Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere*, 67(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.018>
- Ebert, D. (2005). *Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in Daphnia*. *Evolution* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1108/02634501111102760>
- European Commission. (2006). Introduction to the new EU Water Framework Directive. Retrieved October 4, 2018, from [http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro_en.htm)
- European Commission. (2018). A Diretiva-Quadro Água e a Diretiva Inundações: ações tendentes à consecução do «bom estado» da água na UE e à redução dos riscos de inundações. Retrieved December 19, 2018, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52015DC0120&from=EN>
- Farré, M., & Barceló, D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors,

- bioassays and chemical analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), 299–310. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00504-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00504-1)
- FCT-UNL. (2009). Efeito da concentração de NaCl na eclosão do microcrustáceo *Daphnia magna*. Retrieved August 10, 2018, from [https://moodle.fct.unl.pt/pluginfile.php/72073/mod\\_resource/content/0/Fotografias/2007/Daphnia\\_magna.jpg](https://moodle.fct.unl.pt/pluginfile.php/72073/mod_resource/content/0/Fotografias/2007/Daphnia_magna.jpg)
- Fish World. (2010). Rainbow Trout - *Oncorhynchus mykiss*. Retrieved August 10, 2018, from <http://underwater-fish.blogspot.com/2011/11/rainbow-trout-oncorhynchus-mykiss.html>
- Gargosova, H. Z., & Urmínska, B. (2017). Assessment of the efficiency of wastewater treatment plant using ecotoxicity tests. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26, 56–62.
- Hering, D., Buffagni, A., Moog, O., Sandin, L., Sommerhäuser, M., Stubauer, I., ... Zahrádková, S. (2003). The Development of a System to Assess the Ecological Quality of Streams Based on Macroinvertebrates – Design of the Sampling Programme within the AQEM Project. *International Review of Hydrobiology*, 88(34), 345–361. <https://doi.org/10.1002/iroh.200390030>
- Hernando, M. D., Fernández-Alba, A. R., Tauler, R., & Barceló, D. (2005). Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta*, 65(2 SPEC. ISS.), 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.07.012>
- Hillman, W. S. (1961). The *Lemnaceae*, or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *The Botanical Review*, 27(2), 221–287. <https://doi.org/10.1007/BF02860083>
- Hillman, W. S., Jr, D. D. C., & Culley, D. D. (1978). The Uses of Duckweed. *American Scientist*, Vol. 66, 442–451.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., & Chi Chang, C. (2007). Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(1), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.12.005>
- Jackson, R. B., Carpenter, S. R., Dahm, C. N., McKnight, D. M., Naiman, R. J., Postel, S. L., & Running, S. W. (2001). Water in a changing world. *Ecological Applications*. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2001\)011\[1027:WIACW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2001)011[1027:WIACW]2.0.CO;2)
- Kamyab, H., Chelliapan, S., Din, M. F. M., Shahbazian-Yassar, R., Rezanian, S., Khademi, T., ... Azimi, M. (2017). Evaluation of *Lemna minor* and *Chlamydomonas* to treat palm oil mill effluent and fertilizer production. *Journal of Water Process Engineering*, 17(November 2016), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.04.007>
- Lei n.º 17/2014 de 10 de abril. (2014). Estabelecimento das Bases da Política de Ordenamento e de Gestão do Espaço Marítimo Nacional. *Diário Da República: I Série*, 2358–2362.
- Lei n.º 42/2016 de 28 dezembro. (2016). Lei n.º 42/2016, de 28 dezembro: aprova Orçamento do Estado para 2017. *Diário Da República: I Série*, 4875–5107. Retrieved from <https://dre.pt/application/file/a/105630354>
- Lei n.º 44/2017 de 19 de junho. (2017). Estabelece o princípio da não privatização do setor da água, procedendo à quinta alteração à Lei da Água, aprovada pela Lei n.º 58/2005, de 29 de

- dezembro. *Diário Da República: I Série, 1a Serie*(116), 3054. Retrieved from [http://www.cm-lousa.pt/\\_uploads/Lei das Autarquias Locais/lei\\_autarquias\\_locais.pdf](http://www.cm-lousa.pt/_uploads/Lei das Autarquias Locais/lei_autarquias_locais.pdf)
- Les, D. H. D., Crawford, D. J. D., Landolt, E., Gabel, J. D. J., & Kimball, R. T. R. (2002). Phylogeny and Systematics of *Lemnaceae*, the Duckweed Family. *Systematic Botany*, 27, 221–240. <https://doi.org/10.1600/0363644054782215>
- Magalhães, D. de P., & Ferrão-Filho, A. da S. (2008). A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Australis*, 12(03), 355–381. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1203.02>
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- Maul, J. D., Schuler, L. J., Belden, J. B., Whiles, M. R., & Lydy, M. J. (2006). Effects of the antibiotic ciprofloxacin on stream microbial communities and detritivorous macroinvertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(6), 1598. <https://doi.org/10.1897/05-441R.1>
- Mendonça, E., Picado, A., Paixão, S., Silva, L., Cunha, M. A., Nacional, L., ... Lneg, G. I. P. (2011). The Role of Ecotoxicological Evaluation in Changing the Environmental Paradigm of Wastewater Treatment Management. *The 6th Dubrovnik Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems (SDEWES'2011)*. <https://doi.org/10.13140/2.1.2168.3205>
- Metcalf & Eddy. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* (4th Ed). Boston: McGraw-Hill.
- Microbelog. (2012). *Vibrio fischeri* bacteria. Retrieved August 10, 2018, from <https://microbelog.files.wordpress.com/2012/01/vibrio.jpg>
- Modlitbová, P., Novotný, K., Pořízka, P., Klus, J., Lubal, P., Zlámalová-Gargošová, H., & Kaiser, J. (2018). Comparative investigation of toxicity and bioaccumulation of Cd-based quantum dots and Cd salt in freshwater plant *Lemna minor* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147(August 2017), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.053>
- Moreira, R. A., Daam, M. A., Vieira, B. H., Sanches, A. L. M., Reghini, M. V., da Silva Mansano, A., ... Rocha, O. (2017). Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. *Aquatic Toxicology*, 185, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.001>
- National Institutes of Health. (2018). ImageJ. Wisconsin: National Institutes of Health.
- OECD. (1999). *The OECD Lemna growth inhibition test*. Environment Agency.
- OECD. (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment - N°23*, (23), 53. [https://doi.org/ENV/JM/MONO\(2007\)10](https://doi.org/ENV/JM/MONO(2007)10)
- OECD. (2006). Test N.º 221: *Lemna* spp. Growth Inhibition Test, (March), 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264016194-en>
- OECD. (2011). OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. *Organisation for Economic Cooperation and*

- Development*, (April), 1–25. <https://doi.org/10.1787/9789264203785-en>
- Palhinha, R. T. (1939). *Flora de Portugal: plantas vasculares* (2ª edição). Lisboa: Bertrand.
- Parvez, S., Venkataraman, C., & Mukherji, S. (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, 32(2), 265–268. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.022>
- Picado, A., Mendonça, E., Silva, L., Paixão, S. M., Brito, F., Cunha, M. A., ... Hernan, R. (2008). Ecotoxicological assessment of industrial wastewaters in Trancão River Basin (Portugal). *Environmental Toxicology*, 23(4), 466–472. <https://doi.org/10.1002/tox.20359>
- Pinheiro, J. (2011). *Aproveitamento de águas de E.T.A.R. para abastecimento de cisternas, autotanques e equipamentos similares e rega de espaços públicos-O caso da Estação de Tratamento de Águas Residuais de Fernão Ferro no Concelho do Seixal*, Dissertação. Instituto Superior de Agronomia- Universidade Técnica de Lisboa. Retrieved from <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4085/1/TEXT0 TESEdefinitivo.pdf>
- Power, E. A., & Boumphrey, R. S. (2004). International trends in bioassay use for effluent management. *Ecotoxicology*, 13(5), 377–398. <https://doi.org/10.1023/B:ECTX.0000035290.89590.03>
- Prasse, C., Stalter, D., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., & Ternes, T. A. (2015). Spoilt for choice: A critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies. *Water Research*, 87, 237–270. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.023>
- Qu, R. J., Wang, X. H., Feng, M. B., Li, Y., Liu, H. X., Wang, L. S., & Wang, Z. Y. (2013). The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.020>
- Reemtsma, T., Weiss, S., Mueller, J., Petrovic, M., González, S., Barcelo, D., ... Knepper, T. P. (2006). Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: A European perspective. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5451–5458. <https://doi.org/10.1021/es060908a>
- Rizzo, L. (2011). Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Research*, 45(15), 4311–4340. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.035>
- Sánchez-Montoya, M. del M., Arce, M. I., Vidal-Abarca, M. R., Suárez, M. L., Prat, N., & Gómez, R. (2012). Establishing physico-chemical reference conditions in Mediterranean streams according to the European Water Framework Directive. *Water Research*, 46(7), 2257–2269. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.042>
- Schlacher, T. A., Liddell, B., Gaston, T. F., & Schlacher-Hoenlinger, M. (2005). Fish track wastewater pollution to estuaries. *Oecologia*, 144(4), 570–584. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0041-4>
- Silva, A., Figueiredo, S. A., Sales, M. G., & Delerue-Matos, C. (2009). Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris*-A useful tool in hazardous effluents management. *Journal of*

- Hazardous Materials*, 167(1–3), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.102>
- SIMARSUL. (2006). Fernão/Ferro. Retrieved August 15, 2018, from <https://www.simarsul.adp.pt/content/fernaoferro>
- Systat. (2008). Sigma Plot for Windows. Chicago: Systat Software Incorporation.
- Tatarazako, N., & Oda, S. (2007). The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology*, 16(1), 197–203. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0120-2>
- Tothill, I. E., & Turner, A. P. F. (1996). Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 15(5), 178–188. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(96\)80640-6](https://doi.org/10.1016/0165-9936(96)80640-6)
- USEPA. (1996). Ecological Effects Test Guidelines Fish Early-Life Stage Toxicity Test. *Environmental Protection Agency, OPPTS 850*.(EPA 712–C–96–121), 1–15.
- USEPA. (2002a). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Fifth Edition October 2002, (October), 266. <https://doi.org/EPA-821-R-02-012>
- USEPA. (2002b). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, 335. <https://doi.org/http://www.dep.state.fl.us/water/wastewater/docs/ctf.pdf>
- Walker, C. H., Sibly, R. ., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2001). *Principles of ecotoxicology* (2nd ed). Taylor & Francis.
- Webb, S., Ternes, T., Gibert, M., & Olejniczak, K. (2003). Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicology Letters*, 142(3), 157–167. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00071-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00071-7)
- Ziegler, P., Adelman, K., Zimmer, S., Schmidt, C., & Appenroth, K. J. (2015). Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. *Plant Biology*, 17(s1), 33–41. <https://doi.org/10.1111/plb.12184>